

EP 99 / 7127  
4



REC'D 25 OCT 1999	
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Die Artus Gesellschaft für molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH in Hamburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Detektion von Nucleinsäure-Amplifikaten"

am 26. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 Q 1/68 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 5. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 15 141.5

Joost

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4  
D - 22607 HAMBURG

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)  
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE  
DIPL.-ING. ARNULF HUBER  
DR. ALLARD von KAMEKE  
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER  
DR. PETER FRANCK  
DR. GEORG BOTH  
DR. ULRICH-MARIA GROSS  
DR. HELMUT von HEESCH  
DR. JOHANNES AHME  
DR. HEINZ-PETER MUTH  
DIPL.-ING. LARS MANKE  
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU  
DR. BERND JANSSEN

Artus  
Gesellschaft für molekularbiologische  
Diagnostik und Entwicklung mbH  
Gerstäckerstr. 9

20459 Hamburg

26. März 1999  
P 50176 We/lis/wo

Detektion von Nukleinsäure-Amplifikaten

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

- 5 Zur Vervielfältigung von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNA) wurden bislang verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA<sup>®</sup>), entwickelt. Auf diesen Amplifikationstechniken
- 10 basierende Assays werden beispielsweise für den hochsensitiven Nachweis und/oder die Quantifizierung von Erregern im medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt.

DNA-Amplifikationstechniken wie PCR führen zur Erzeugung großer

15 Mengen amplifizierter Target-DNA (oder über einen initialen Reverse Transkriptase-Schritt zu amplifizierter RNA). Üblicherweise werden die Amplifikationsprodukte nach einer definierten Zeit mit Hilfe von Post-Amplifikationsmethoden - im allgemeinen durch Hybridisierung - nachgewiesen (Endpunktanalyse).

20 Gemäß einem neuen Ansatz - "TaqMan<sup>®</sup>" - zur quantitativen PCR wird Fluorescence Resonance Transfer (FRET; vgl. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986-994) mit doppelt fluoreszenzmarkierten DNA-

Sonden zur Echtzeitdetektion der DNA-Amplifikation vorgeschlagen). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Sonde am Target haften bleibt, bis sie durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase entfernt wird. Die Stringenz ist aufgrund des 5 Temperaturprofils der PCR nur sehr schwer kontrollierbar, und die Lösung dieses Problems durch entsprechende Sondenkonstruktion ist nur unter großem Aufwand denkbar. Ein weiterer Nachteil des TaqMan<sup>®</sup> ist die Erzeugung eines äquimolaren Signals, d.h., daß pro Amplifikationszyklus nur ein Sondenmolekül pro amplifiziertem 10 DNA Target-Molekül gespalten wird, was ein vergleichsweise schwaches Signal zur Folge hat.

Bei NASBA<sup>®</sup> handelt es sich - im Gegensatz zur thermozyklischen PCR - um eine homogene, isotherme *in vitro* Amplifikation (vgl. 15 z.B. T. Kievits et al, J. Vir. Meth. 35 (1991) 273-286), EP 0 329 822 sowie R. Sooknanan et al. in "Molecular Methods for Virus Detection", D.L. Wiedbrauk und D.H. Farkas (Ed.), Academic Press 1995, Kapitel 12, 261-285). Gegenüber anderen Amplifikationsverfahren weisen die NASBA<sup>®</sup> und andere isotherme Reaktionen den 20 Vorteil auf, daß sie ohne besonderen technischen Aufwand durchgeführt werden können, da die Amplifikation bei einem einzigen Temperaturwert erfolgt und diese Reaktionsbedingungen während des gesamten Prozesses beibehalten werden. Damit verkürzt nicht auch die Dauer jedes Amplifikationsschrittes. In Verbindung mit der z.B. im Vergleich zur PCR hohen Amplifikationseffizienz werden so mit Hilfe der NASBA<sup>®</sup> und anderer isothermer Amplifikationstechniken hohe Amplifikat-Konzentrationen in kurzer Zeit erreicht. Ein weiterer Vorteil der NASBA<sup>®</sup> gegenüber der PCR ergibt sich aus der selektiven Nachweismöglichkeit von RNA. Dies 30 spielt insbesondere im Zusammenhang mit der Amplifikation bzw. Quantifizierung von zellulärer mRNA eine Rolle, bei der mögliche zelluläre DNA-Kontaminationen vermieden werden können.

Ein Nachteil der NASBA<sup>®</sup> und anderer isothermer Amplifikations- 35 strategien ist jedoch, daß eine Echtzeitdetektion mit Hilfe von Fluoreszenz wie bei dem auf PCR basierenden TaqMan<sup>®</sup> (Perkin Elmer) oder Light-Cycler (Roche Diagnostics) nicht möglich ist.

Die in diesem Zusammenhang vorgeschlagene Endpunktanalyse zur Quantifizierung ist mit Schwierigkeiten verbunden, da im Falle des Nachweises unterschiedlicher Target-RNA-Konzentrationen manche Proben bereits das Sättigungsniveau (Plateauphase) erreicht haben können, während sich andere Proben noch in der Phase steigender Amplifikat-Konzentrationen befinden (vgl. auch Heid et al., a.a.O.). Ferner ist diese Endpunktsanalyse aufgrund zusätzlicher Arbeitsschritte nach der erfolgten RNA-Amplifikation aufwendiger und zeitintensiver. Aufgrund des Erfordernisses, die Reaktionsgefäße für die Quantifizierungsschritte zu öffnen, besteht außerdem das Risiko einer Kreuzkontamination hoch-amplifizierter RNA- und DNA-Targets.

Von Leone et al. (Nucleic Acids Research 26 (1998) 2150-2155) wurde ein Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA<sup>®</sup>-amplifizierter RNA vorgeschlagen, bei dem man eine zweifach fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet. Im Gegensatz zum PCR-Verfahren (vgl. Heid et al., a.a.O.) haftet die Sonde am Target an und wird bei der Amplifikationsreaktion nicht entfernt. Dies führt zu potentiellen Komplikationen, da die DNA-Sonden während der frühen Amplifikationsstufen mit der Bindung an die ersten Antisense-RNA-Amplifikate interferieren können, was zum RNase H-Abbau und damit zu Eliminierung von RNA-Substraten und in der Folge zu einer fehlerhaften Konzentrationsbestimmung führen kann. Die Genauigkeit der quantitativen Target-Bestimmung hängt ferner in entscheidendem Maß von der Menge der zugesetzten Sonde ab.

Das von Leone et al. vorgeschlagene System erlaubt allerdings nur eine sehr schlechte Quantifizierung, unabhängig davon, ob man die bevorzugte Auswertung auf Basis des Schwellenwerts (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 100 fg und 1 pg überlappen zu Beginn) oder nach Erreichen des Plateaus (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 1 pg und 10 pg überlappen am Ende) durchführt.

Ferner ist nur eine sehr geringe Stringenz möglich, da die Sonde am Target haften bleibt und die isotherme Reaktion bei relativ geringer Temperatur (41° C) erfolgt, was ein hohes Risiko falsch

positiver Ergebnisse zur Folge hat. Offensichtlich könnte, abhängig von der Sonde, ein maximales Signal sogar bei geringeren Temperaturen erhalten werden (vgl. Leone et al., Figur 7), aber aufgrund der gewählten Versuchsdurchführung hätte dies ein  
5 zusätzliches Risiko für falsch positive Resultate zur Folge. Wie im Rahmen weiterer Untersuchungen anhand des von Leone et al. vorgeschlagenen Protokolls festgestellt wurde, variiert die optimale Temperatur für die Hybridisierung des Fluoreszenzmarkers in Abhängigkeit von der Länge bzw. der Sequenz des hybridisierenden Target-Abschnitts.  
10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand der  
15 Technik bekannten Methoden, insbesondere des Verfahrens von Leone et al., vermeidet und für Routineanwendungen geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 gelöst.

20 Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, bei dem man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
- 30 b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül  
35 ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

10

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

15

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aufgrund des über den Primer eingeführten bzw. an die Nukleinsäureamplifikate angehängten Sequenzmotivs A und des in der Sonde verwendeten Motivs B die Bildung eines Hammerkopf-Ribozyms ermöglicht, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Das erfindungsgemäße Prinzip ist schematisch in Fig. 1 (sowie Fig. 2 bis 16) dargestellt. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich möglich, Sequenzen auszunutzen, die anstelle des Hammerkopf-Ribozyms zur Ausbildung anderer, kleinerer Ribozyme (z.B. des "Hairpin-Ribozyms" oder des "Hepatitis Delta")  
30 geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Quantifizierung von RNA, DNA oder RNA/DNA-Chimären (d.h. Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden enthaltenden Nukleinsäuren), die als  
35 "Target-Nukleinsäure" bezeichnet werden, wobei gegebenenfalls eine dem Verfahren vorgeschaltete Aufschmelzung doppelsträngiger Nukleinsäuren zum Erhalt von Einzelsträngen erforderlich ist.



Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Amplifikationsverfahren handelt es sich vorzugsweise um isotherme Amplifikationsverfahren wie NASBA<sup>®</sup>, Transcription Mediated Amplification (TMA; vgl. z.B. M. Hirose et al., J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 3122-6) oder Self-sustained Sequence Replication (3SR; vgl. E. Fahy et al. in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991, 25-33) oder um cyclische Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR.

10 Soweit hierin nichts anderes angegeben ist kann es sich bei den Nukleotiden A, C und G jeweils um Ribonukleotide (rNTP) oder Desoxyribonukleotide (dNTP) handeln. "N" kann für ein beliebiges Ribo- oder Desoxyribonukleotid stehen. Im Falle von RNA/DNA-Chimären (d.h. Oligonukleotiden, die sowohl Ribo- als auch Desoxyribonukleotide enthalten) sind die obligatorischen Ribonukleotide mit dem Präfix "r" versehen (d.h. rA, rC, rG) bzw. U. Die Sequenzmotive A und B der Sonden können somit entweder ausschließlich aus Ribonukleotiden (RNA-Sonde) bestehen oder RNA/DNA-Chimäre sein. Beim Motiv A ist es jedoch erforderlich, 15 daß am 3'-Ende in jedem Fall das Ribonukleotid Adenin (rA) eingesetzt wird (d.h. 5'-GAA(rA)-3'). Beim Motiv B (5'-CUGANGA-5') ist es erforderlich, daß Guanin als Ribonukleotid vorliegt und Adenin am 3'-Ende ebenfalls ein Ribonukleotid (rA) ist (d.h. 5'-CU(rG)AN(rG)(rA)-3'). U kann gegebenenfalls durch T ausgetauscht sein. 20

Unter "Fluoreszenz-Schwellenwert" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der um den Faktor 5-10 über der unter vergleichbaren Bedingungen (d.h. Reaktionsmischung ohne Target- oder Referenz-Nukleinsäure) gemessenen Hintergrundschwankung liegt. 30

Die Zeit  $t_p$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis soviele Amplifikate der Target-Nukleinsäure gebildet sind, daß der Fluoreszent-Schwellenwert (Schwellenwert) erreicht ist. 35

Die Zeit  $t_{\text{Ref.}}$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis ausgehend von einer Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration so viele Amplifikate gebildet sind, daß der Schwellenwert erreicht ist. Die Referenznukleinsäure sollte in ihrer Nukleinsäuresequenz nur geringfügig von der Target-Nukleinsäuresequenz abweichen, damit eine möglichst genaue Quantifizierung erreicht wird.

Um die Konzentration der Target-Nukleinsäure möglichst exakt bestimmen zu können mißt man vorzugsweise mehrere  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für Referenz-Nukleinsäuren unterschiedlicher Konzentration, so daß der gemessene  $t_p$ -Wert möglichst zwischen zwei  $t_{\text{Ref.}}$ -Meßpunkten liegt und somit eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann. Vorzugsweise mißt man drei  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für eine Referenz-Nukleinsäure bei drei unterschiedlichen Konzentrationen und ermittelt die sich daraus ergebende Meßkurve (Eichkurve). Die Target-Nukleinsäure unbekannter Konzentration kann anschließend durch Bestimmung des  $t_p$ -Wertes durch Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

20

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren durchgeführt, indem man die Target-Nukleinsäure in gleichzeitiger Anwesenheit einer oder mehrerer, vorzugsweise von drei Referenz-Nukleinsäuren bekannter Konzentration durchführt, und zur Detektion verschiedene sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Sequenzen der Referenz-Nukleinsäuren in einem Amplifikationsansatz unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und sollten Varianten der Target-Nukleinsäure sein. Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz die  $t_p$ - und  $t_{\text{Ref.}}$ -Werte gleichzeitig bestimmt und somit ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand die Konzentration ( $c_{\text{rel.}}$ ) der Target-Nukleinsäure bestimmt werden (sogen. "Multiplexing"; vgl. auch US 5,837,501).

35 Anstelle der Verwendung eines das Sequenzmotiv A enthaltenen Primers und einer das Sequenzmotiv B enthaltenden Sonde ist auch die umgekehrte Kombination gleichermaßen geeignet, d.h. die



Kombination aus einem das Motiv B enthaltenden Primer und einer das Motiv A enthaltenden Sonde.

Als Reporter kommen praktisch alle Fluoreszenz-Farbstoffe und  
5 insbesondere die in Tab. 17 angegebenen Farbstoffe (vor allem  
FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7,  
IRD 41 oder La Jolla Blue (TIB MOLBIOL) in Frage. Vorzugsweise  
handelt es sich bei den Reporter-Farbstoffen um Substanzen mit  
hohem Fluoreszenzsignal (d.h. hoher "Lichtausbeute") bei geringem  
10 "Photobleaching".

Als Quencher können Farbstoffe eingesetzt werden, die bei  
Wellenlängen > ca. 500 nm absorbieren. Unter den in Frage  
kommenden Substanzen sind TAMRA, LCR, CY-5 oder DABCYL bevorzugt.

15

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reporter/Quencher-  
Kombinationen bevorzugt, die eine Anregung bei ca. 490 nm und  
eine Emission bei < ca. 650 nm (TaqMan<sup>®</sup> SDS 7700, Perkin Elmer)  
oder < 700 (Light Cycler, Boehringer) gestatten. Die Fluoreszenz  
20 kann praktisch mit jedem handelsüblichen Fluorimeter gemessen  
werden.

Beim Multiplexing bietet sich die Kombination des universellen  
Quenchers DABCYL mit Reporter-Farbstoffen wie Coumarin (emit-  
tierte Fluoreszenz bei 475 nm), FAM (emittierte Fluoreszenz bei  
515 nm), BODIPY (emittierte Fluoreszenz bei 525 nm), TAMRA (emit-  
tierte Fluoreszenz bei 575 nm), Texas Red (emittierte Fluoreszenz  
bei 615 nm), CY-5 (emittierte Fluoreszenz bei 674 nm) usw. an  
(vgl. z.B. S. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53).

30

Sollte die zu amplifizierende Nukleinsäure bereits die Sequenzmo-  
tive 5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3' ("Ribozym-Motive") enthalten,  
kann das Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echt-  
zeitdetektion erfindungsgemäß ebenfalls durchgeführt werden,  
35 wobei - aufgrund des bereits in der Target-Nukleinsäure enthalte-  
nen Ribozym-Motivs - unmarkierte Primer eingesetzt werden, d.h.  
Primer, an die Motiv A oder Motiv B nicht angehängt sind. Die

12.09.99

Detektion erfolgt schließlich, indem man die Nukleinsäure-Amplifikation - vorzugsweise NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR oder PCR - in Gegenwart eines Überschusses einer Sonde durchführt, die das jeweils zum in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motiv 5 "komplementäre" Motiv enthält. Unter "komplementäres Motiv" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Motiv verstanden, das - abhängig von dem in der Target-RNA enthaltenen Ribozym-Motiv (5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3') zur Ausbildung einer Hammerkopf-Ribozym-Struktur (Hammerhead-Ribozym) erforderlich ist.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, bei dem man

15

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der für das Motiv A im Transkript kodiert, amplifiziert wird, wobei man

20

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

30

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »C<sub>rel.</sub>« nach folgender Formel bestimmt:

35

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit erstmals eine quantitative Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren (d.h. RNA, DNA oder RNA-DNA-Chimären) im Rahmen einer isothermen Nukleinsäureamplifikation, z.B. mittels NASBA<sup>®</sup>, TMA oder 3SR, möglich. Im Falle der NASBA<sup>®</sup> werden insbesondere die dem System von Leone et al. (a.a.O.) anhaftenden Probleme umgangen. Ferner kommt es nicht zu einer möglichen Konkurrenz zwischen Detektion und Amplifikation, da die Sonde - eine RNA-Substratsonde - nicht am Target haften bleibt sondern abgespalten und freigesetzt wird, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt wird. Ferner ist von Vorteil, daß RNase H die Target-RNA im Hybrid aus RNA-Substratsonde und RNA-Target nicht abbauen kann. Ferner ist die Menge der RNA-Substratsonde nicht kritisch, und sie kann in einem sehr hohen Überschuß, wie z.B. 500 nM gegenüber 2 nM Ribozym-Target oder 0,066 nM Ribozym, eingesetzt werden.

Gegenüber den auf der PCR-basierenden Echtzeitverfahren wie TaqMan<sup>®</sup> oder Light Cycler<sup>®</sup> weist das erfindungsgemäße Verfahren unter isothermen wie unter cyclischen Temperaturbedingungen (PCR) ebenfalls Vorteile auf. Aufgrund der Möglichkeit, im Rahmen eines Amplifikationsschrittes mehrere Sonden zu spalten, kann ein vergleichsweise höheres Signal generiert werden. Dieses führt zu einer höheren Sensitivität der Reaktion und zu einer verkürzten Reaktionszeit. Zudem ist die Signalgenerierung aufgrund der enzymatischen Spaltung grundsätzlich steuerbar. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in der hohen Spezifi-

tät der Reaktion, da nur eine exakte Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zum Spaltungsprozeß und damit zum Entstehen eines signifikanten Signals führt. ferner ist insbesondere im Vergleich zum TaqMan<sup>®</sup> keine aufwendige Sondenkonstruktion notwendig, da  
5 sich die Sonde nach jedem Spaltungsprozeß von der Zielsequenz löst. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht in der Möglichkeit des Multiplexing

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt aufgrund der enzymatischen  
10 Spaltung der Sonde eine sehr gute und exakte lineare Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Ribozym-System erzeugt die Hybridisierung selbst nur ein sehr schwaches Signal, während jedes in der amplifizierten Nukleinsäure vorhandene Ribozym eine Vielzahl von Nukleinsäure-Substratsonden spaltet. Diese weitere Amplifikation  
15 ist sehr spezifisch und erfordert das Vorliegen einer vollständig hybridisierenden Sequenz (vgl. Singh et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 6 (1996) 165-168). Ohne das Risiko, falsch positive Resultate zu erhalten, können Temperatur und sonstige Reaktionsbedingungen optimiert werden, um zu einem maximalen  
20 Fluoreszenzsignal zu kommen. Beispielsweise können synthetische Peptide (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429), CTAB (Nedbal et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-7) oder GAP-DH (Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789) zugesetzt werden, die die Effizienz, wie z.B. die Hybridisierungsgeschwindigkeit, und die Spezifität der Target-Erkennung erhöhen können.

Gegenüber den im Stand der Technik angewandten oder vorgeschlagenen Amplifikationsverfahren mit Target-Quantifizierung können durch die vorliegende Erfindung die Stabilität der RNA-Sonde  
30 erhöht und deren Kosten gleichzeitig reduziert werden. So ist es z.B. möglich, nahezu alle, bei der chemischen Synthese teureren Ribonukleotide durch 2'-Desoxyribonukleotide zu ersetzen, die billiger und gegenüber Abbau (durch längerfristige Lagerung, Einwirkung von Nukleasen, Metallionen wie Magnesium, sowie Hitze  
35 usw.; vgl. Bratty et al., Biochim. Biophys. Acta 1216 (1993) 345-359) stabiler sind.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der allgemeinen Ribozym-Struktur und Effizienz des Verfahrens sind unter anderem folgende Modifikationen möglich:

- 5 Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, d.h. um mehr Signale bezogen auf die Anzahl amplifizierter Nukleinsäure-Moleküle zu erzeugen, sollte auf den Spaltungsort des Ribozyms die Sequenz UA folgen (vgl. Clouet-d'Orval et al., Biochemistry 36 (1997) 9087-9092). Ferner sollte die Position X (vgl. Figur 4B) die  
10 modifizierte Base Pyridin-4-on (vgl. Burgin et al., Biochemistry 35 (1996) 14090-14097) enthalten, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Detektionsstufe führt.

Durch das Ersetzen der meisten Ribonukleotide durch Desoxy-  
15 ribonukleotide können die Kosten für eine RNA-Sonde um bis das 10fache gesenkt werden. An vier Positionen sind Ribonukleotide jedoch essentiell, die z.B. in Fig. 2B, 4B, 15 und 16 mit "r" gekennzeichnet sind (vgl. Byang et al., Biochemistry 31 (1992) 5005-5009). In den hierin vorhandenen Tabellen werden zur  
20 Unterscheidung von Desoxy- und Ribonukleotiden ferner Großbuchstaben (für dNTPs) und Kleinbuchstaben (für rNTPs) verwendet.

Ferner hat sich gezeigt, daß chimäre DNA/RNA Hammerkopf-Ribozyme eine erhöhte katalytische Effizienz und Stabilität aufweisen (N.R. Taylor et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 4559-4565). Dieses Prinzip kann man erfindungsgemäß insbesondere für Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR ausnutzen, die bei höheren Temperaturen oder bei cyclischen Temperaturprofilen durchgeführt werden.

30

Zusätze wie z.B. das Protein GAP-DH (vgl. Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789), kurze synthetische Peptide, die vom Viral coat protein (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429) abgeleitet sind oder die chemische Substanz CTAB (Netbal  
35 et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-13557) sind geeignet, die Effektivität des Verfahrens im Hinblick auf das Auffinden von in großen Nukleinsäure-Strukturen "versteckten" Targets, d.h.

Ribozym-Motiven, zu erhöhen.

Auf Basis der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, mehrere verschiedene Targets simultan durch Verwendung entsprechender Ribozym-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen nachzuweisen. Dabei sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich, die selektiv an den jeweils nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren anhaften und bei Ribozym-Spaltung Fluoreszenz-Signale unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen. Beispielsweise ist es möglich, den Quencher DABCYL mit Reporter-Farbstoffen, wie z.B. Cumarin (Fluoreszenzemission bei 475 nm), FAM (Fluoreszenzemission bei 515 nm), BODIPY (Fluoreszenzemission bei 525 nm), TAMRA (Fluoreszenzemission bei 575 nm), Texas red (615 nm), CY-5 (674 nm) usw., zu kombinieren (vgl. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53). Mit diesem sogenannten "Multiplexing" ist es somit möglich, innerhalb eines Reaktionsansatzes gleichzeitig eine Target-RNA sowie mehrere Referenzproben bekannter Konzentration, deren Sequenzen sich im Primer-bindenden Abschnitt jeweils geringfügig voneinander unterscheiden, zu amplifizieren, wobei durch Sequenz-spezifische Sonden, die unterschiedliche Reporter/Quencher-Kombinationen tragen, eine Quantifizierung erfolgen kann, ohne daß getrennte Amplifikationen und Fluoreszenzmessungen mit den RNA-Referenzproben durchgeführt werden müssen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren, der entweder

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (oder 5'-CUGANGA-3') im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikationsreaktion,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50

Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

- 5 e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt,

oder

- 10 a) zwei Amplifikationsprimer,  
b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,  
c) eine Nukleinsäure-Sonde vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder  
15 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls  
d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

20

umfaßt.

Gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung werden erstmals ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man  
30 eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide) in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-  
35 Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweisen muß und man die Nukleinsäure durch



Erhalt eines der Wahl der Reporter- und Quencher-Moleküle entsprechendes Fluoreszenzsignals nachweist.

Ein erfindungsgemäßer Kit zur Durchführung dieses Nachweisverfahrens umfaßt neben zur Durchführung der Reaktion erforderlichen Lösungsmittel und Reagenzien eine Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül (s.o.) angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

Für den Fall, daß die Target-Nukleinsäuren keines der Sequenzmotive A oder B enthalten, kann die Nukleinsäure nachgewiesen werden, indem eines der Motive z.B. durch Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines oben genannten Primers eingeführt wird. Zur Detektion ist eine entsprechende doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (s.o.) erforderlich, die ein zur Ribozym-Bildung geeignetes Sequenzmotiv enthält.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits wird - mit oder ohne Einsatz einer Nukleinsäure-Amplifikation - eine neue Methode zum Erreger-Nachweis zur Verfügung gestellt. Wie im folgenden angegeben enthält beispielsweise die 16S rRNA vieler Erregerspezies bereits natürlicherweise ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv, das zur Bildung des Hammerkopf-Ribozyms ausgenutzt werden kann. Falls die Nukleinsäuren der Erreger keine zur Ausbildung von Ribozymen geeignete Sequenzmotive enthalten können diese, wie oben angegeben, im Rahmen der Amplifikationsstufen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt bzw. "addiert" werden.



GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	145-175	180-210
E. coli	---	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Salmonella	---	ataactactgGAAAcggttagctaa	---
Staphylococcus	---	ataactctggGAAAcggttagctaa	gttcaaaagtGAAAgagcgttttgg
C. perfringens	tttcctcggGAAAcggttagctaa	atagcctccGAAAgggaagctaa	tcaataatgtGAAAgatggcattca
Vibrio	atagtcagggGAAAcggttagctaa	ataaactctgGAAAcggttagctaa	---
B. cereus	---	ataaactccggGAAAcggttagctaa	cgcatgggttcGAAAtGAAAggacg
C. botulinum	---	atagcctccGAAAgggaagctaa	---
Campylobacter	---	ataaactctgGAAAcggttagctaa	gttgaataggGAAAggtttttcgggt
Yersinia	---	ataactactgGAAAcggttagctaa	---
Listeria	---	ataactccggGAAAcggttagctaa	ccatgggtttGAAAgatgggttttgg

Region in E.coli 16S rRNA	370-400	485-515	595-625	625-655
E. coli	---	---	agttaagatgtGAAAtccccgggct	---
Salmonella	---	---	agtccggaatgtGAAAtccccgggct	atactgcatctcGAAAcgtgcaaggct
Staphylococcus	cgcaatggggGAAAgccttagcggga	tacctaatacaGAAAgccaccaggcta	agtcctgatgtGAAAgccaccaggct	agggtcattgGAAAcctgGAAAcact
C. perfringens	agggtcattgGAAAcctgGAAAcact	---	agtggggaatgtGAAAtccccgggct	---
Vibrio	---	---	agtcaggaatgtGAAAgccttagcggct	nattggcattGAAAcctggaagact
B. cereus	cgcaatgggacGAAAgcttagcggga	tacctaatacaGAAAgccaccaggcta	agtcctgatgtGAAAgccaccaggct	agggtcattgGAAAcctggaagact
C. botulinum	cgcaatggggGAAAccttagcggga	---	agtggggaatgtGAAAtccccgggct	---
Campylobacter	cgcaatggggGAAAccttagcggga	---	agtcctgatgtGAAAtccccaggct	nattgggttggGAAAccttagctagct
Yersinia	---	---	cagtcaggaatgtGAAAtccccaggct	nattggcattGAAAcctggaagact
Listeria	cgcaatgggacGAAAgcttagcggga	tatctaaccaGAAAgccaccaggcta	agtcctgatgtGAAAgccttagcggct	agggtcattgGAAAcctggaagact



Region in E.coli 16S rRNA	650-680	685-715	755-780
E. coli	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctcaggcgCGAAAgcgtggggag
Salmonella	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctcaggcgCGAAAgcgtggggag
Staphylococcus	ttgGAAActgGAAAccttgagtc	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctgtagtgcGAAAgcgtggggat
C. perfringens	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctgaggcgCGAAAgcgtggggag
Vibrio	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	---
B. cereus	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	actgaggcgCGAAAgcgtggggag
C. botulinum	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctgaggcgCGAAAgcgtgggttag
Campylobacter	---	---	gctaggcgCGAAAgcgtggggag
Yersinia	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagaga	gctcaggcgCGAAAgcgtggggag
Listeria	---	ggttagcgggGAAAlgcgtagata	gctgaggcgCGAAAgcgtggggag

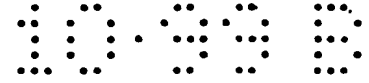
Region in E.coli 16S rRNA	895-925	1000-1050	1065-1095	1245-1275	1305-1335
E. coli	---	---	ctcgtgttgGAAAlgttgggtta	---	---
Salmonella	---	---	ctcgtgttgGAAAlgtcgggtta	---	---
Staphylococcus	ccgcaagggtGAAActcaaggaa	---	---	aaaggcgCGAAAcgctagggtc	---
C. perfringens	---	cttaatcgagGAAActctcagggt	---	---	attgtaggcgGAAAcctca
Vibrio	---	---	ctcgtgttgGAAAlgttgggtta	gccaactgcGAAAgtagagaat	---
B. cereus	ccgcaaggcgGAAActcaaggaa	---	---	---	---
C. botulinum	---	---	---	---	---
Campylobacter	---	---	---	---	---
Yersinia	---	---	ctcgtgttgGAAAlgttgggtta	---	---
Listeria	ccgcaagggtGAAActcaaggaa	---	---	---	---



GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	115-145	145-175	190-210
S. aureus	---	---	ataactcggGAAACcggagctaa	gttcaatagGAAAGcggctctg
S. epidermidis	---	---	ataactcggGAAACcggagctaa	gttcaatagGAAAGcggctctg
S. pneumoniae	---	---	ataactatGAAACgtagctaa	---
S. pyogenes	---	---	ataactatGAAACgtagctaa	---
E. faecalis	cactcnaattGAAAgagtagtggc	---	ataactcgtGAAACcgggtctaa	gcataagagGAAAGcggctctg
N. meningitidis	---	---	ataactcgtGAAAGatcagctaa	tcttgagagGAAAGcggggacc
E. coli	---	taattgtctggGAAACtgcctgaig	ataactcgtGAAACcggtagctaa	---
Enterobacter spec.	---	taattgtctggGAAACtgcctgaig	ataactcgtGAAACcggtagctaa	---
Proteus spec.	---	ggtaacaggGAAAGcttgcttc	ataactcgtGAAACcggtagctaa	---
P. aeruginosa	---	---	ataactcgtGAAACcggtagctaa	tcttgagagGAAAGcgggtatc
P. fluorescens	---	---	ataactcgtGAAACcggtagctaa	tcttacgggaGAAAGcggggacc
P. mendocina	---	---	ataactcgtGAAAGgaacgctaa	tcttacgggaGAAAGcggggacc
P. syringae	---	---	ataactcgtGAAACcggtagctaa	tcttacgggaGAAAGcggggacc
H. influenzae	---	ggtagcaggGAAAGcttgcttc	ataactcgtGAAACcggtagctaa	taaagggggGAAAGcttgcttc
H. ducreyi	---	---	ataactcgtGAAACcgttagctaa	---
Bacteroides spec.	---	---	ataactcgtGAAAGaataaa	---

Region in E.coli 16S rRNA	370-400	450-480	485-515	515-545	545-575
S. aureus	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	---	tacctaatacaGAAAgccacggccta	agtcigatgtGAAAgccccacggct	agggctcallgGAAAcctgGAAAcact
S. epidermidis	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	---	tacctaatacaGAAAgccacggccta	agtcigatgtGAAAgccccacggct	agggctcallgGAAAcctgGAAAcact
S. pneumoniae	---	tgtagagagtgGAAAgctcacacig	tatctaccaGAAAggggacggccta	---	gtaggcttgGAAAcctgtttaact
S. pyogenes	---	ggtagagagtgGAAAgatccaccaag	taactaaccaGAAAggggacggccta	---	gtacgcttgGAAAcctgggagaact
E. faecalis	ggcaatgggcGAAAgctgacgga	---	tatctaaccaGAAAgccacggccta	agtcigatgtGAAAgccccccggct	agggctcallgGAAAcctgggagact
N. meningitidis	---	tgtagagagtgGAAAgggtgttgc	---	agcaggatgtGAAAcctcccgggct	---
E. coli	---	---	---	agtcagatgtGAAAcctcccgggct	---
Enterobacter spec.	---	---	---	aagtcagatgtGAAAcctcccgggct	aactgcaatgtGAAAcctggcagct
Proteus spec.	---	---	---	agtcagatgtGAAAgcccccgagct	aactgcaatgtGAAAcctggcagct
P. aeruginosa	---	---	---	agcttgatgtGAAAcctcccgggct	---
P. fluorescens	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	---	---	agcttgatgtGAAAcctcccgggct	---
P. mendocina	gacaatgggcGAAAgcctnatcca	---	---	agcttgatgtGAAAgcccccgggct	---
P. syringae	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	---	---	agcttgatgtGAAAcctcccgggct	---
H. influenzae	cgcaatgggcGAAAcctgatgca	---	---	agtgagggtgtGAAAgccccgggct	---
H. ducreyi	cacaatgggcGAAAcctgatgca	---	---	agtgagggtgtGAAAgccccgggct	---
Bacteroides spec.	---	---	---	agtcagatgtGAAAgcttgggct	aactgcaatgtGAAAcctggcagct



Region in E.coli 16S rRNA	650-680	660-680	685-715	745	755-780
S. aureus	tTgGAAActgGAAAacttgagTgc	TgcagaagagGAAAgtgggaattcc	gTgtagcggTGAATgCgcagaga	---	gctgcatgTgcGAAAgcgtTggggat
S. epidermidis	tTgGAAActgGAAAacttgagTgc	TgcagaagagGAAAgtgggaattcc	gTgtagcggTGAATgCgcagaga	---	gctgcatgTgcGAAAgcgtTggggat
S. pneumoniae	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	caccggTggcGAAAgcggcTcTcT	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
S. pyogenes	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	caccggTggcGAAAgcggcTcTcT	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
E. faecalis	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
N. meningitidis	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
E. coli	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
Enterobacter spec.	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
Proteus spec.	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgtagggcTcGAAAgcgtTggggag
P. aeruginosa	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	actgtagggTgcGAAAgcgtTggggag
P. fluorescens	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	actgtagggTgcGAAAgcgtTggggag
P. mendocina	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	actgtagggTgcGAAAgcgtTggggag
P. syringae	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	actgtagggTgcGAAAgcgtTggggag
H. influenzae	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgcatgTgTGAAGgcgtTggggag
H. ducreyi	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	gctgcatgTgcGAAAgcgtTggggag
Bacteroides spec.	---	---	gTgtagcggTGAATgCgtagata	---	actgtagTgcTcGAAAgcgtTggggat

Region in E.coli 16S rRNA	845-875	895-925	1065-1095	1245-1275	1400-1430
S. aureus	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	aaaggcagcGAAAcgcgaggTc	---
S. epidermidis	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	aaaggtagcGAAAcgcgaggTc	---
S. pneumoniae	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	---	---
S. pyogenes	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	---	---
E. faecalis	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	---	---
N. meningitidis	gctaaagcgtGAAAtgacgcct	---	---	---	---
E. coli	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgtgggtta	---	---
Enterobacter spec.	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgtgggtta	---	---
Proteus spec.	---	---	tcgttgtgtGAAAtgtgggtta	---	---
P. aeruginosa	---	---	---	---	---
P. fluorescens	---	---	---	---	---
P. mendocina	---	---	---	---	---
P. syringae	---	---	---	---	---
H. influenzae	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgtgggttn	ecgaattctcaGAAAtgtgcatctaa	---
H. ducreyi	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgtgggttn	---	---
Bacteroides spec.	---	cgcgaaggTGAACtcaaaggaa	---	---	gaataaagtgGAAAcgttagcc

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

### Beschreibung der Figuren:

5

Fig. 1: Allgemeines Schema der NASBA<sup>®</sup> kombiniert mit Ribozymen zur Echtzeitdetektion.

Ribozym-Motiv innerhalb eines der zwei Primer. Es ist nur eine Möglichkeit gezeigt, bei der sich das Ribozym-Motiv am 3'-Ende der amplifizierten RNA befindet. Die RNA Substrat-Sonde ist mit einem Fluorezenzfarbstoffen markiert, dem Reporter (Kreis) und einem Quencher (Dreieck). In der intakten Sonde führt die effiziente Wechselwirkung beider Labels zum "FRET" or Quenching, d.h. zu keinem (or nur sehr schwachem) Reporter-Signal (leerer Kreis). Das Ribozym spaltet viele Sonden-Moleküle. In der gespaltenen Sonde werden beide Labels getrennt, und es wird ein starkes Reporter-Signal erzeugt (gefüllte Kreise).

Fig. 2: A: Allgemeine Struktur von Hammerkopf-Ribozymen. Es sind nur konservierte Nukleotide mit entsprechenden buchstaben bezeichnet, alle nicht-konservierten Positionen sind mit N angegeben. Die Länge der hybridisierenden Arme können den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden. Drei Orte möglicher Hairpin-Schleifen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die Polarität (5'-3' Richtung) ist nur für den gespaltenen Abschnitt angegeben. B: Entspricht Fig. 2A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

30

Fig. 3: Eine Möglichkeit zur Aufspaltung eines minimalen Ribozyms und einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv wurde auf GAAA verkürzt.

35 Fig. 4: A: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem

minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher (einige wenige Möglichkeiten sind unten angegeben) an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden. B: Entspricht

5 Fig. 4A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

10 Fig. 5: Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv ist auf CUGA-N-GA reduziert.

15 Fig. 6: Basierend auf der in Fig. 5 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden (vgl. Fig. 4).

20 Fig. 7: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge des Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

30 Fig. 8: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte

35 Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.



Fig. 9: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung, gefolgt von einem sehr kurzen 3'-terminalen basengepaarten Abschnitt. Wie gezeigt ist, kann dieser Abschnitt mit dem Ribozym-Motiv überlappen, und die Ausbuchtung kann so kurz sein, daß sie nur ein Nukleotid umfaßt. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 10: Basierend auf der in Fig. 2B dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung gefolgt von einer einzigen rA-T Basenpaarung mit der Target-Sequenz. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 11: Entspricht der in Fig. 10 dargestellten Möglichkeit. Hier enthält die Target-Sequenz jedoch bereits einen längeren stretch des Ribozym-Motivs (oder, wie gezeigt, des vollständigen Motivs).

Fig. 12: Beispielhafte Struktur eines DNAzyms (= katalytische DNA). Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rA vorhanden sein.

Fig. 13: Beispielhafte Struktur eines weiteren DNAzyms. Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rRrY vorhanden sein.

Fig. 14: Entspricht Fig. 10, wobei der Primer den überwiegen-

den Teil des NAzym-Motivs (des katalytischen Nukleinsäure-Motivs) enthält und nur die zwei letzten Nukleotide fehlen. Gezeigt ist hier eine Möglichkeit basierend auf "Prototyp A".

Für "Prototyp B" ermöglicht das Vorliegen längerer Motive

- 5 (z.B. TCGTTG statt TCGT) ein deletierteres Motiv im Primer einzusetzen, wobei das 3'-terminale ACGA im elongierten Primer durch die Target-Sequenz geliefert wird.

Fig. 15: Beispiel für eine universelle Ribozym-Sonde.

10

Fig. 16: Beispiel für eine HIV Ribozym-Sonde.

Fig. 17: A-C: Für die erfindungsgemäße Echtzeitdetektion als Reporter/Quencher geeignete Farbstoffe

15

### BEISPIELE

Material:

20

Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Primer und Sonden sind auf dem Fachmann geläufigem Wege erhältlich, wie z.B. durch Oligonukleotidsynthese.

#### Beispiel 1

NASBA<sup>®</sup>-Reaktion in Kombination mit Ribozym-abhängiger Detektion:

30

Alle Enzyme waren kommerziell von Pharmacia erhältlich, ausgenommen AMV-Reverse Transkriptase, die von Seikagaku bezogen wurde.

- 35 23µl NASBA<sup>®</sup> Reaktionsmischung, davon 5 µl aus der Aufreinigung nach Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503)



(finale Konzentration in 25 µl Reaktionsmischung: 40 mM Tris, pH 8,5, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 42 mM KCl, 15 % v/v DMSO, 1 mM jedes dNTP, 2 mM jedes NTP, 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2 und 0,1-0,5 µM Substrat-Sonde) wurden bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert um eine Destabilisation der Sekundärstrukturen in der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde für das Primer-Annealing auf 41 °C abgekühlt. Die Amplifikation wurde durch Zugabe von 2 µl Enzym-Mischung (0,1 µg/µl BSA, 0,1 Einheiten RNase H, 40 Einheiten T7 RNA Polymerase und 8 Einheiten AMV Reverse Transkriptase) gestartet. Die Reaktion wurde bei 41 °C für 90 Minuten inkubiert. Während der Reaktion wurden die Fluoreszenzsignale im ABI Prism 7700 Sequence Detector gemessen. Als Reporter/Quencher wurde die Kombination FAM/TAMRA eingesetzt.

#### Experiment A:

Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT  
CAC TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-GAA TCT CAT CAG TAG CGA GTG GGG GGA CAT CAA  
GCA GCC ATG CAA A-3'

Substrat A: 5'-TAMRA-Tga auc gaa acg cga aag cgu cua gcg u-  
FAM-3'

#### Experiment B:

Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT  
CAC TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-ACG TAG TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGC GTG  
CAG TGG GGG GAC ATC AAG CAG CCA TGC AAA-3'

Substrat B: 5'-TAMRA-Tac gua guc cgu gcu-FAM-3'

Quantifizierung:

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe  
 5 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

10	Q1	ca.	1 000 000 Moleküle (RNA)
	Q2	ca.	100 000 Moleküle (RNA)
	Q3	ca.	10 000 Moleküle (RNA)
	Q4	ca.	1 000 Moleküle (RNA)

15 Die Experimente A und B führten zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach  $t = 15$  Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert  
 20 für ein definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times$  Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach  $t = 20, 24$  und  $26$  Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der  
 25 Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 200 000 ( $t = 18$ ) bzw. 15 000 ( $t = 23$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

30

Beispiel 2

Universelle Erkennung beliebiger (full-size) amplifizierter  
 35 RNA-Targets (ribozyme motive in reverse primer). Die entsprechende "Universelle Ribozym-Sonde" wurde dem NASBA<sup>®</sup>-Amplifika-

tionskit zugesetzt.

An seinem 3'-Ende enthält der reverse Primer die übliche Target-spezifische Sequenz (N) und zusätzlich an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die für das allgemeine universelle Ribozym-Motiv codiert:

5'-GCG TTT CGA TTC CNN NNN N...

Das Transcript endet mit der Sequenz

10 5'-...N NNN NNG GAA UCG AAA CGC

Die Ribozym-Sonde wies folgende Sequenz auf:

5'-GCG UC - U AGC GGA AAC GCU ACU GAX GAG AUU CC (32-mer)  
- Spaltungsort

15

Zwei Farbstoffe, 5'-Q and 3'-R (oder 3'-Q und 5'-R) waren mit den Enden verknüpft.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe  
20 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

21	Q1	ca.	1 000 000 Moleküle (RNA)
	Q2	ca.	100 000 Moleküle (RNA)
	Q3	ca.	10 000 Moleküle (RNA)
	Q4	ca.	1 000 Moleküle (RNA)

30 Das Experiment in Beispiel 2 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach  $t = 12$  Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert  
35 für ein definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times$  Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten

nach  $t = 18, 22$  und  $25$  Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca.  $100\,000$  ( $t = 18$ ) bzw.  $8000$  ( $t = 23$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

10 Diese Beispiel-Sonde kann an einem oder beiden Enden durch mehr Basen-gepaarte Nukleotide verlängert sein.

### Beispiel 3

15 Spezifische Erkennung einer amplifizierten Target Sequenz: proximal zu einem der Primer:

Das vorliegende spezifische Beispiele anhand einer NASBA<sup>®</sup>-gestützten Detektion von HIV (entspr. USP 5,837,501) durchgeführt.

Amplifiziertes Segment der HIV-RNA:

20 agtgggggacatcaagcagctatgcaa(c,t)gttaaaagatactatcaatgaggaagc-tgcagaatgggacagggtacatccagtacatgcagggcctattccaccaggccagatgaga-gaaccaaggggaagtgcatagca

30 (es ist nur ein Strang gezeigt, die Primer-Sequenzen sind unterstrichen). Die proximale Sequenz ist ebenfalls hoch konserviert und schließt den folgenden Abschnitt ein:  
agcagctatgGaaa(c,t)gttaaaaga

35 Der Vorwärtsprimer zur Einführung der T7 Promotor-Sequenz (Großbuchstaben) and 1 Punktmutation (fettgedruckter Großbuchstabe):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGagtgggggacatcaagcagctatgGaaa

Das Transkriptionsprodukt enthält das GAAA Ribozym-Motiv, das mit der proximalen HIV-spezifischen Sequenz verknüpft ist:

5 GGGagcagctatgGaaa(c,t) gttaaaaga....

Es kann insbesondere mit der komplementären Ribozym-Sonde, entsprechend dem allgemeinen Versuchsprotokoll durchgeführt werden.

10 Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

Q1	ca.	1 000 000	Moleküle (RNA)
Q2	ca.	100 000	Moleküle (RNA)
Q3	ca.	10 000	Moleküle (RNA)
20 Q4	ca.	1 000	Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 3 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs AM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach  $t = 22$  Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times$  Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach  $t = 24, 28$  und  $33$  Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca.  $400\,000$  ( $t = 23$ ) bzw.  $10\,000$  ( $t = 28$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

#### Beispiel 4

- 5 A. GAAA in rRNA-Abschnitten zur spezifischen Detektion von Bakterien-Spezies.

In den obigen Tabellen sind die wichtigsten, durch Lebensmittel übertragene Pathogene aufgeführt.

10 Einzigartige Sequenzmotive (schattiert) liegen zwischen den Positionen 110 and 700 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor.

Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind  
15 bekannt: 110f and 700r [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

20

B. Spezifischen Detektion von Sepsis-Erregern.

In den obigen Tabellen sind ferner die wichtigsten Sepsis-Erreger aufgeführt.

25

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert), die erfindungsgemäß ausgenutzt werden können liegen zwischen den Positionen 110 and 530 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor.

Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt:  
30 [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

Die in der 16S rRNA enthaltenen Sequenzmotive können für die  
35 erfindungsgemäßen Verfahren ausgenutzt werden, so daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verfahren zum Nachweis von



10.10.99 8

- 32 -

Erregern, insbesondere von Sepsis-Erregern und Lebensmittelkeimen, und dafür vorgesehene Kits zur Verfügung gestellt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
  - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
  - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »C<sub>rel.</sub>« nach folgender Formel bestimmt:

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

t<sub>p</sub> der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

t<sub>Ref.</sub> der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

2. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

3. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $C_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis

einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Son-denmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekenn-

zeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
12. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.
13. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmo-



tiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cyclor Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er
  - a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,
  - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
  - c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
  - d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CU-

GANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CU-GANGA-3' im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CU-GANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte



und Hilfsmittel

umfaßt.

21. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

22. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

23. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

24. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.

25. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

26. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.

27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA<sup>®</sup>, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA<sup>®</sup> ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
29. Kit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA<sup>®</sup> Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
30. Kit zur Durchführung des Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
1. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.

12.10.99 8

- 42 -

### Zusammenfassung

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

NASBA

RNA

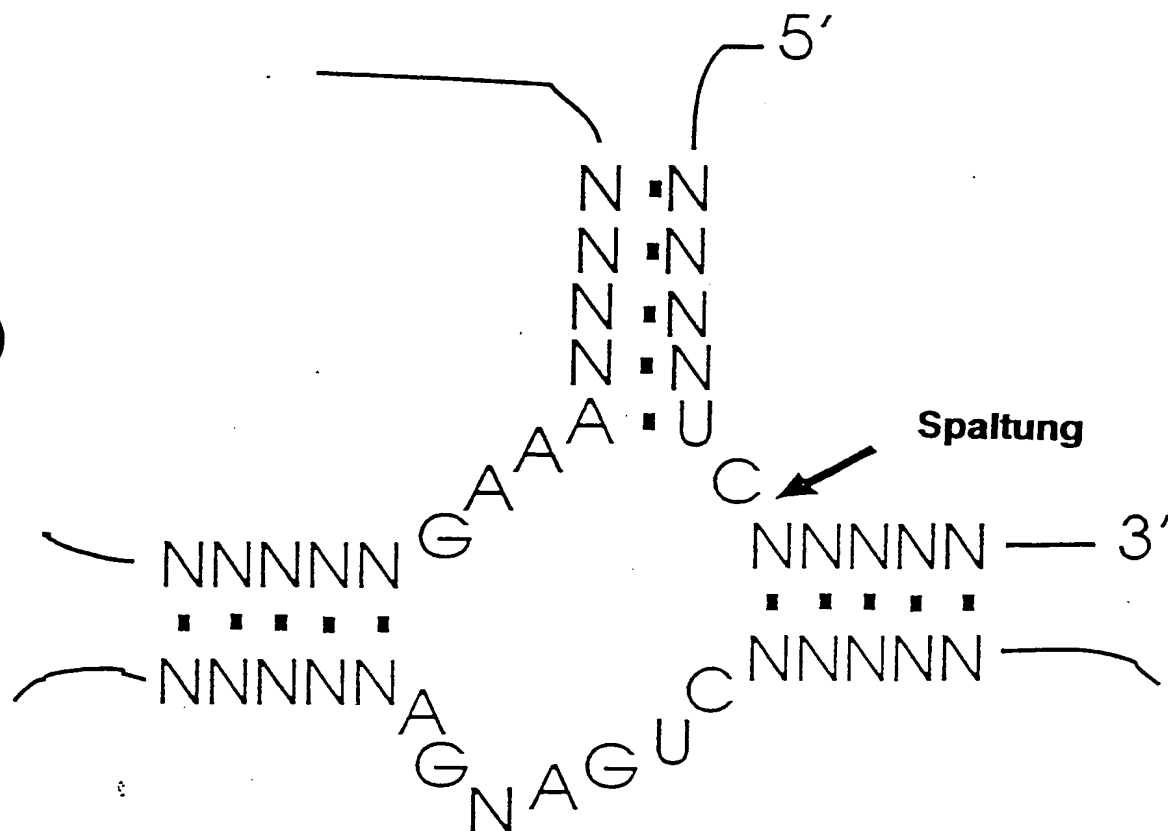


"probe" = Sonde

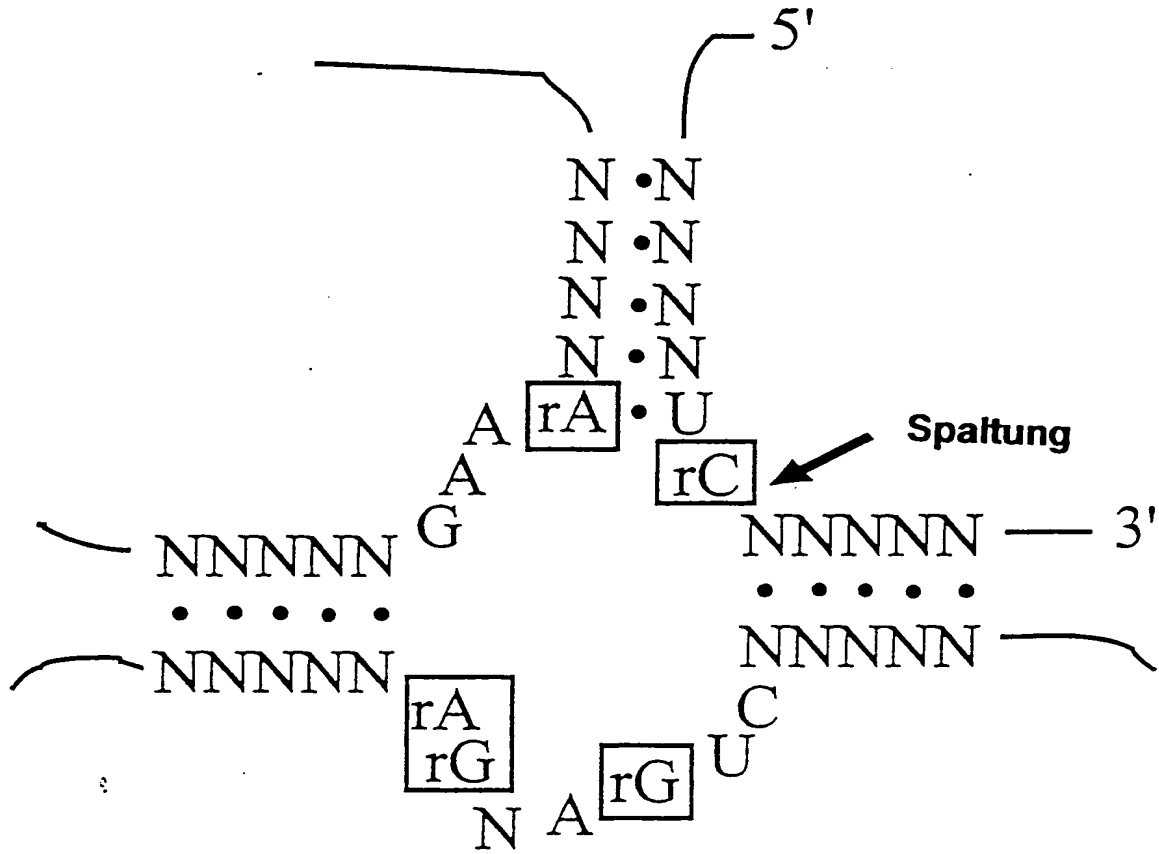
### Figur 1

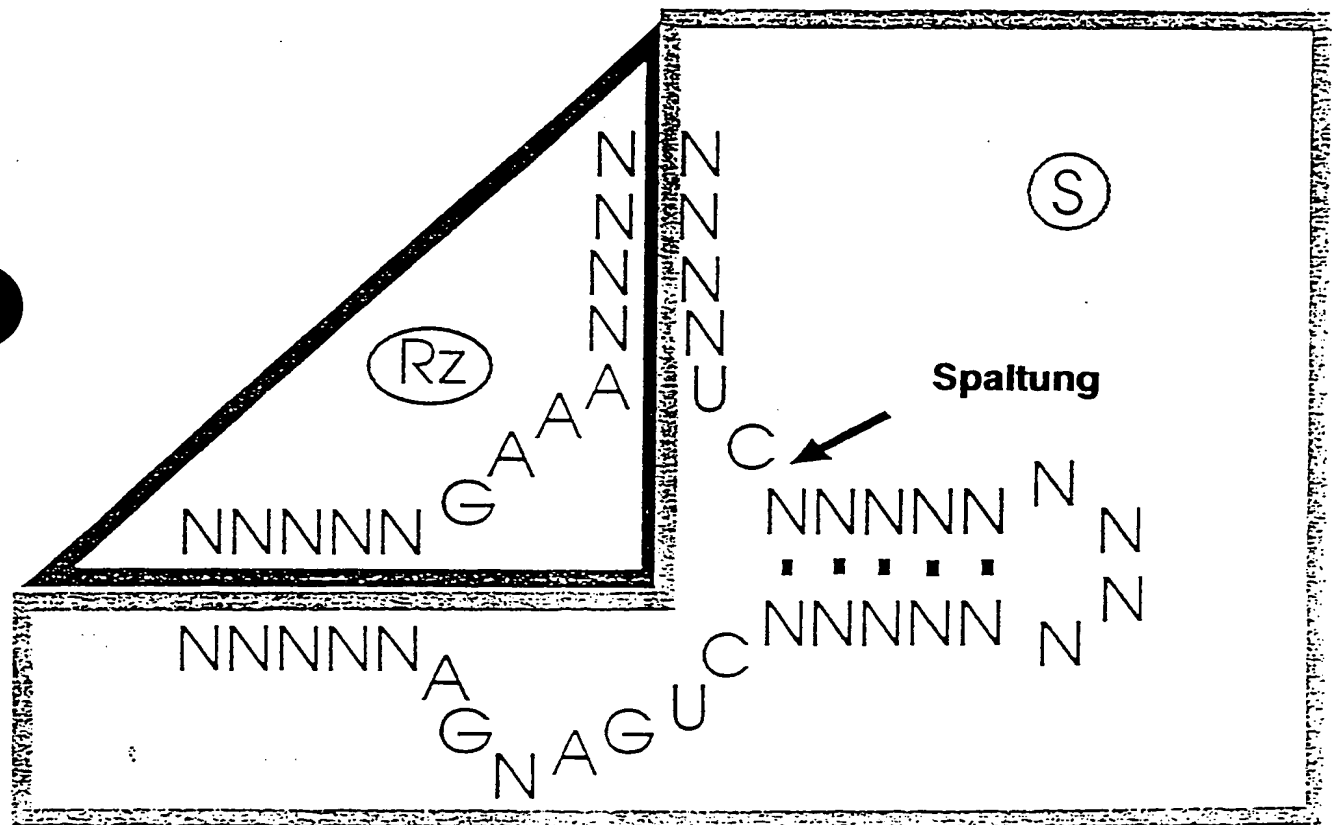
12.10.99 8

Figur 2A



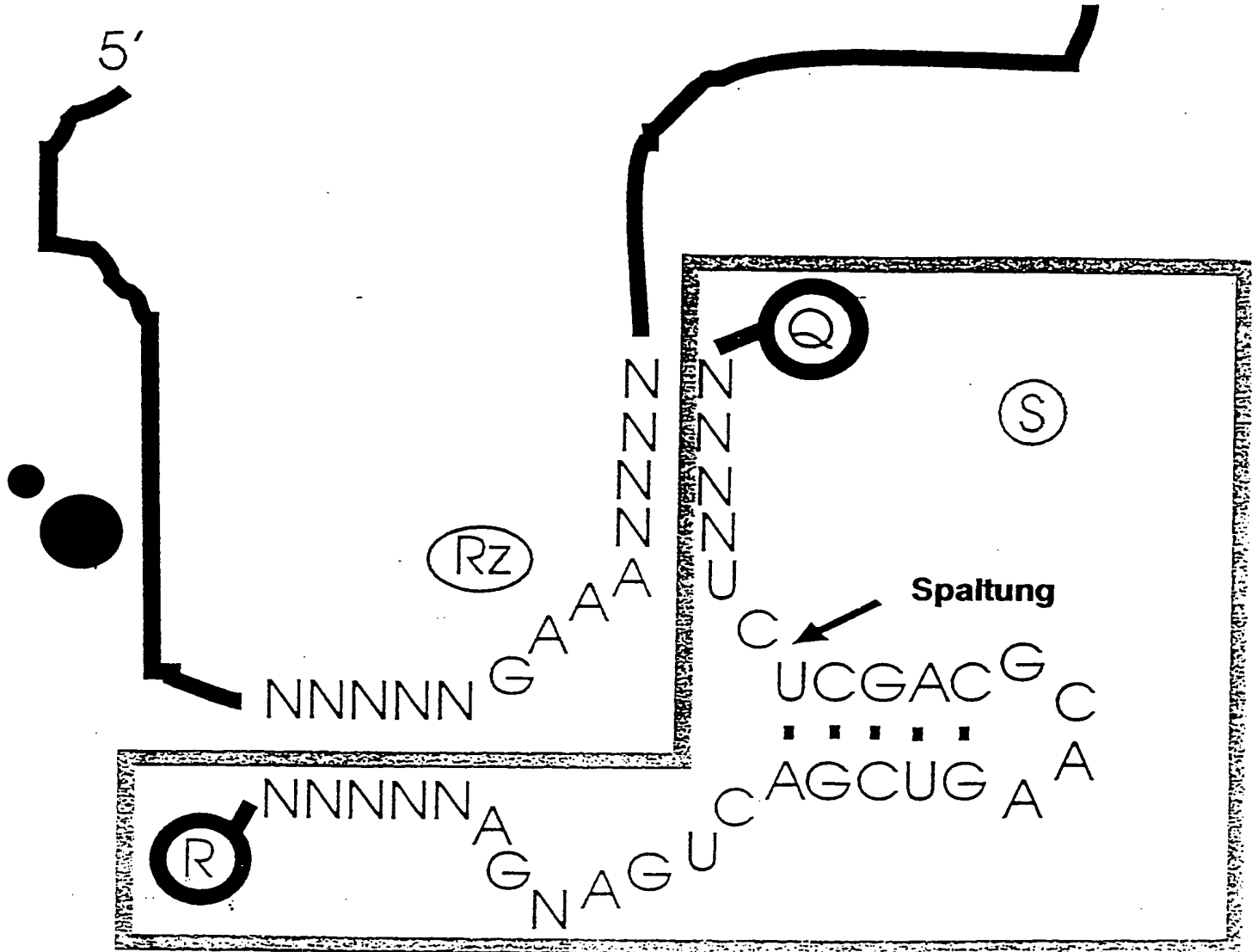
Figur 2B





Figur 4A

12:00:30  
RNA



R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

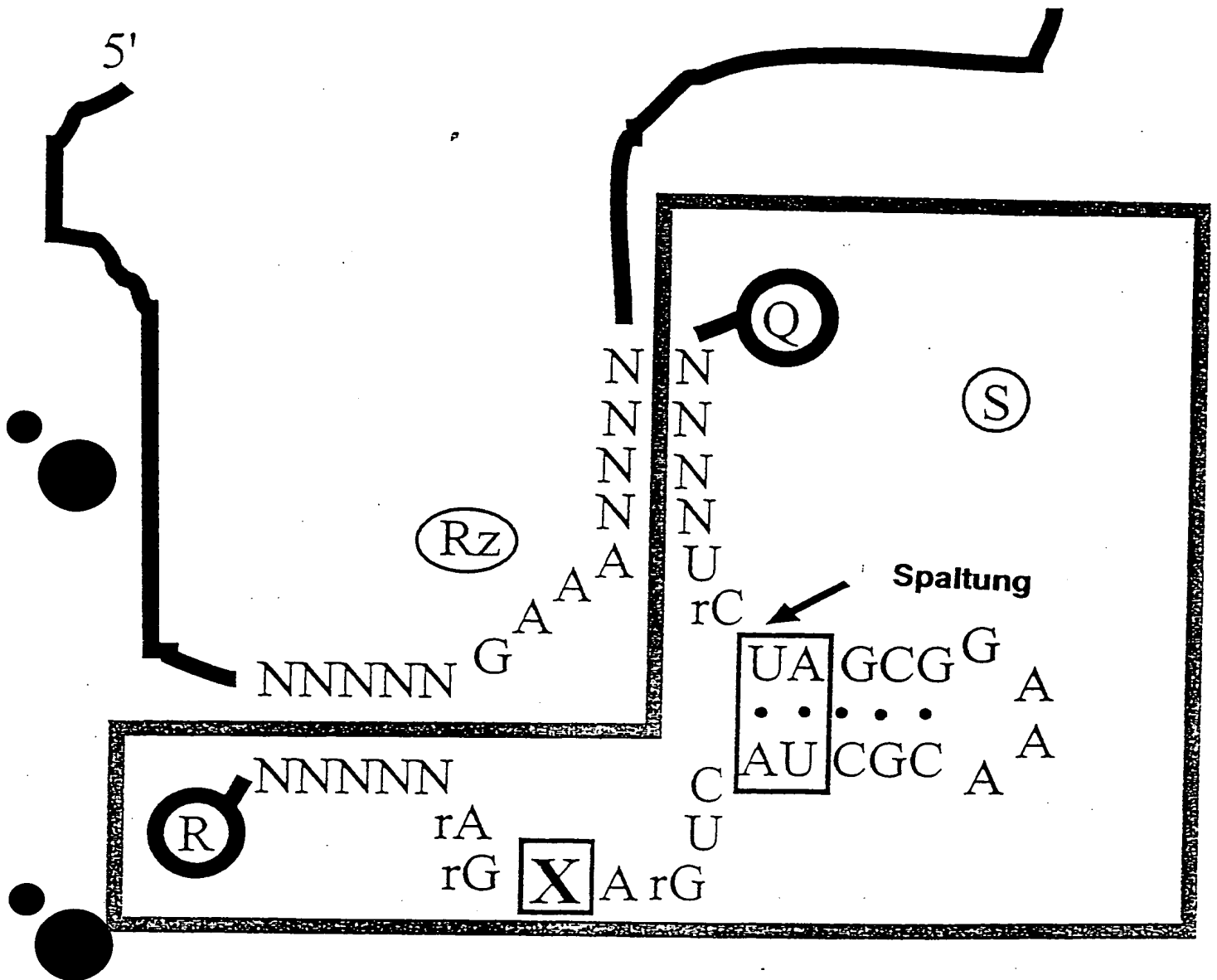
Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR

etc.



10 10 00 0

Figur 4B



R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR

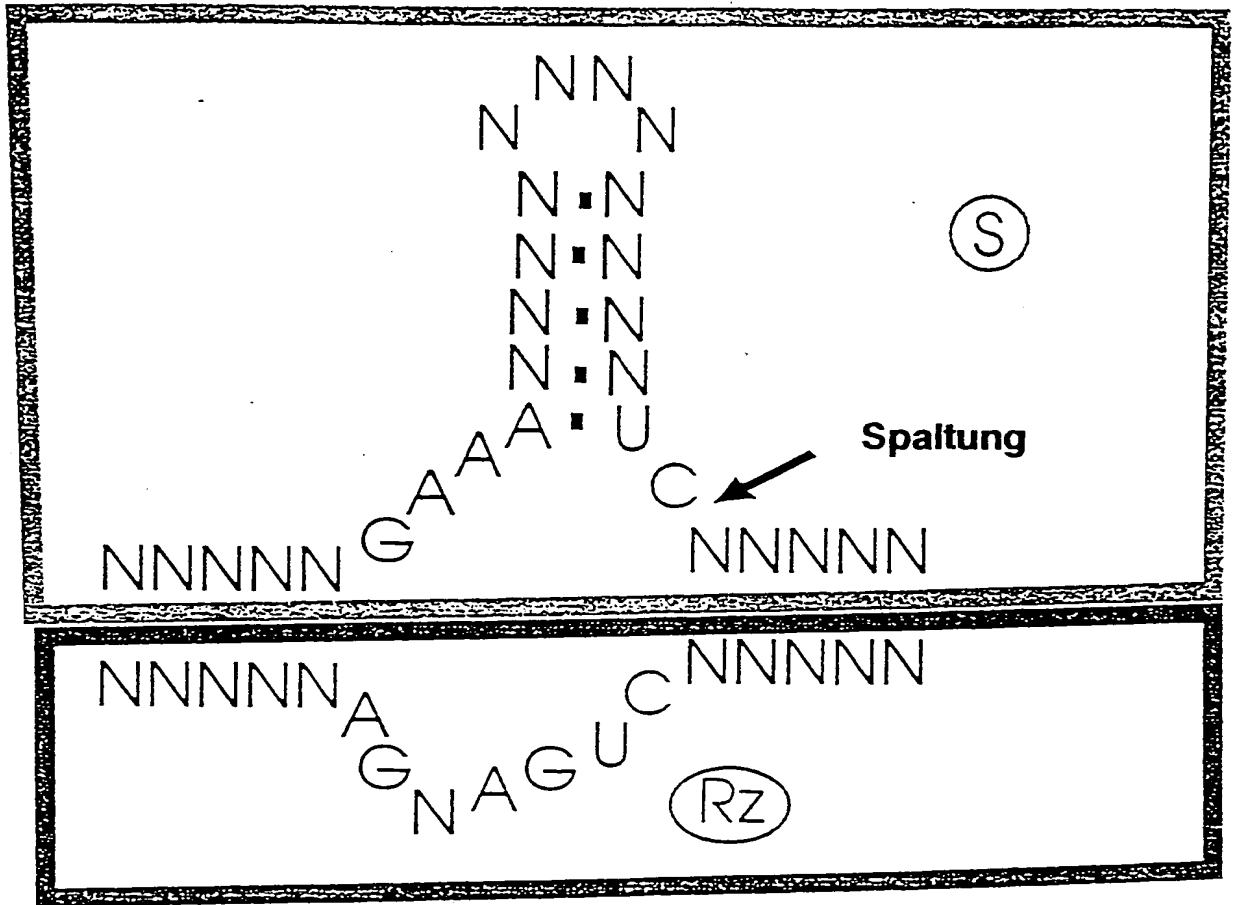
X = Pyridin-4-one

r = essentielle Ribonukleotide

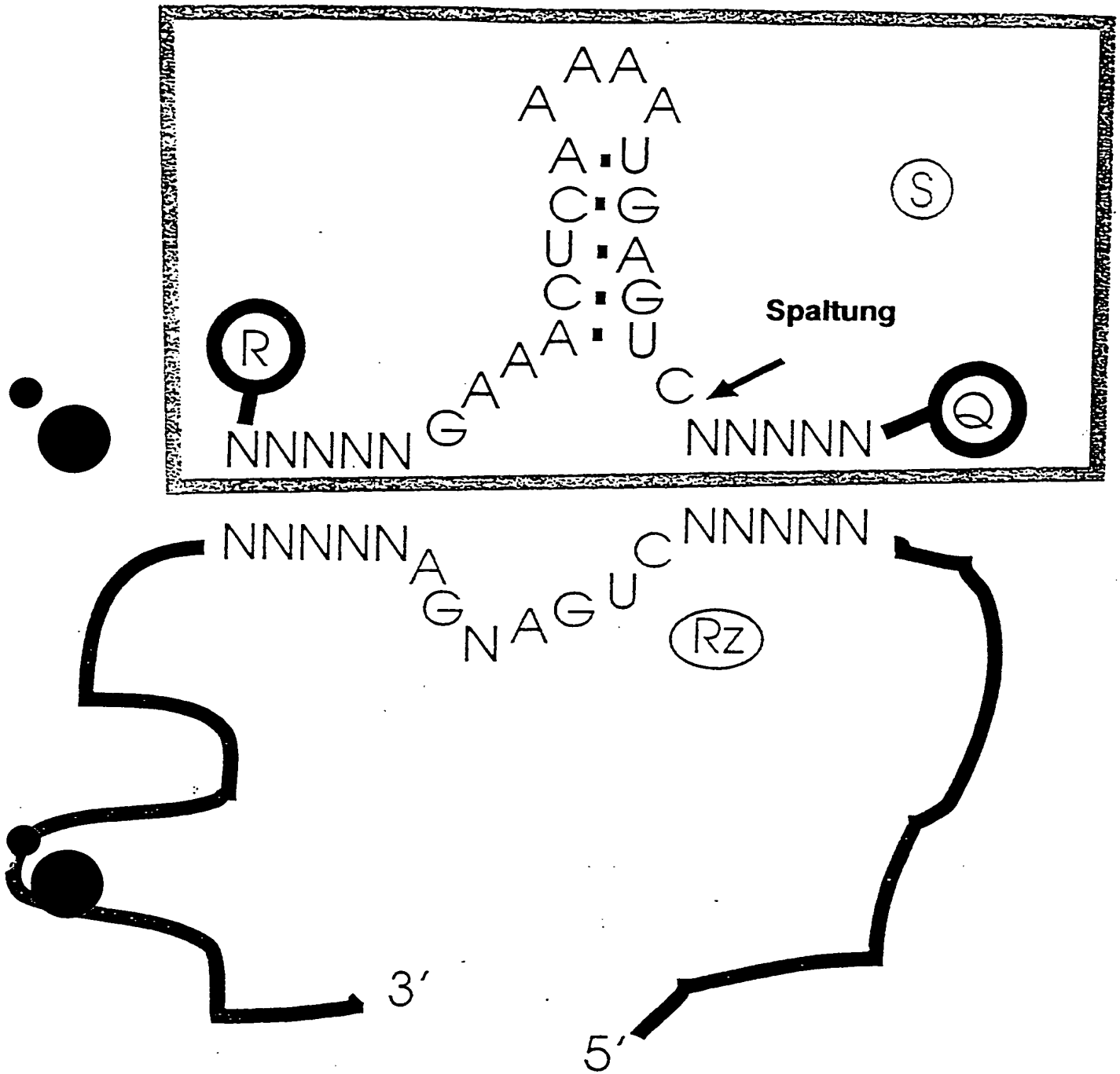
wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

12.10.99 B

Figur 5

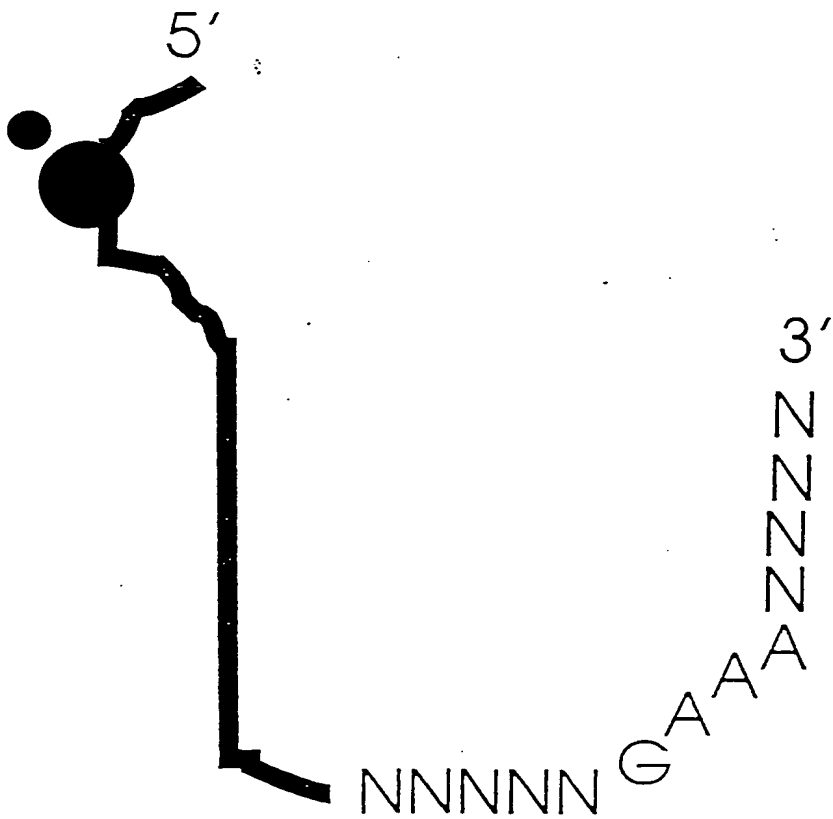
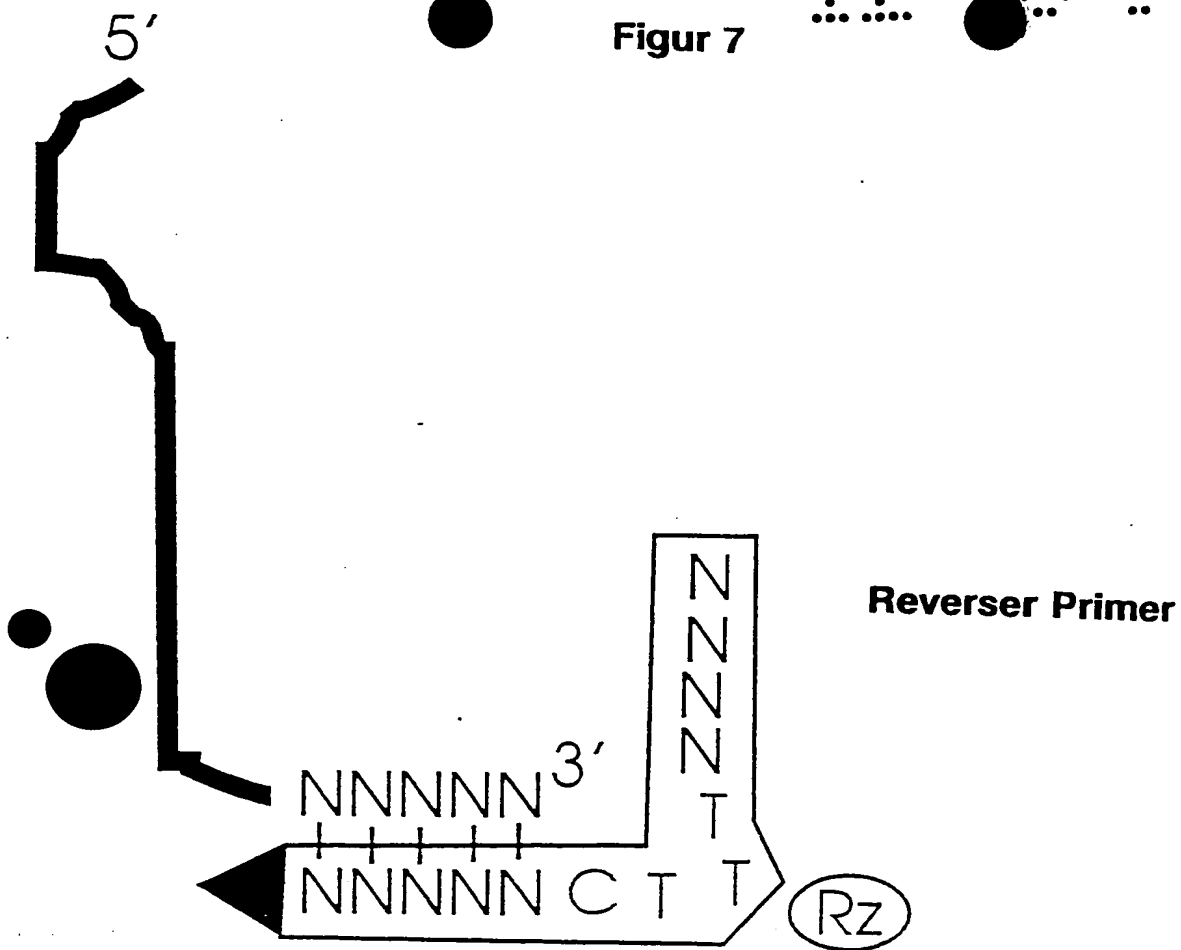


Figur 6

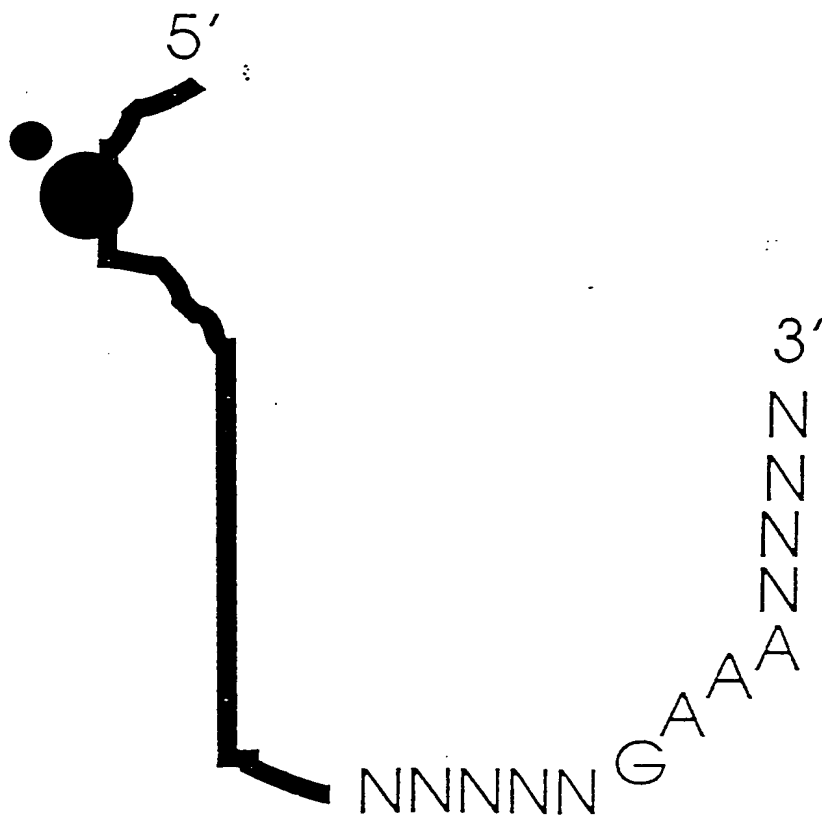
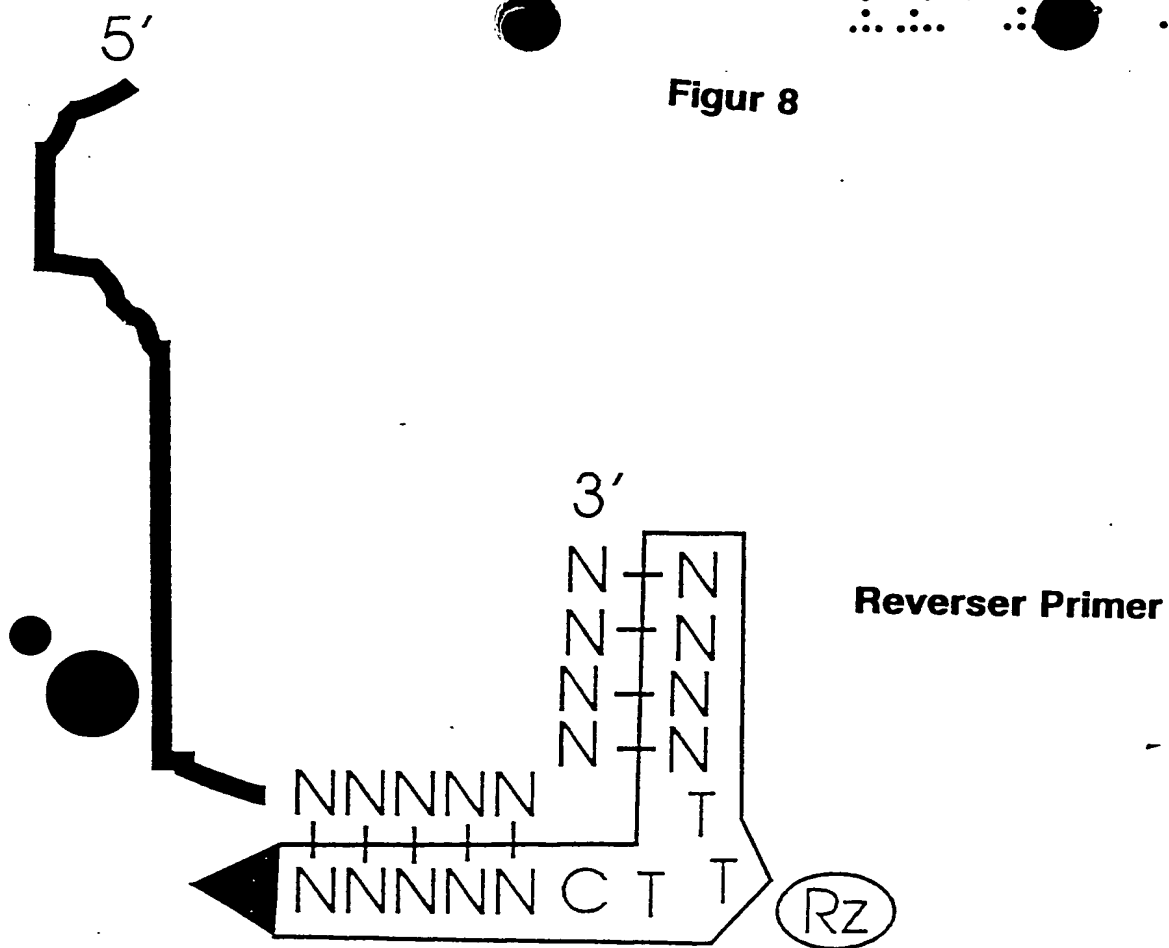


12.10.99 8

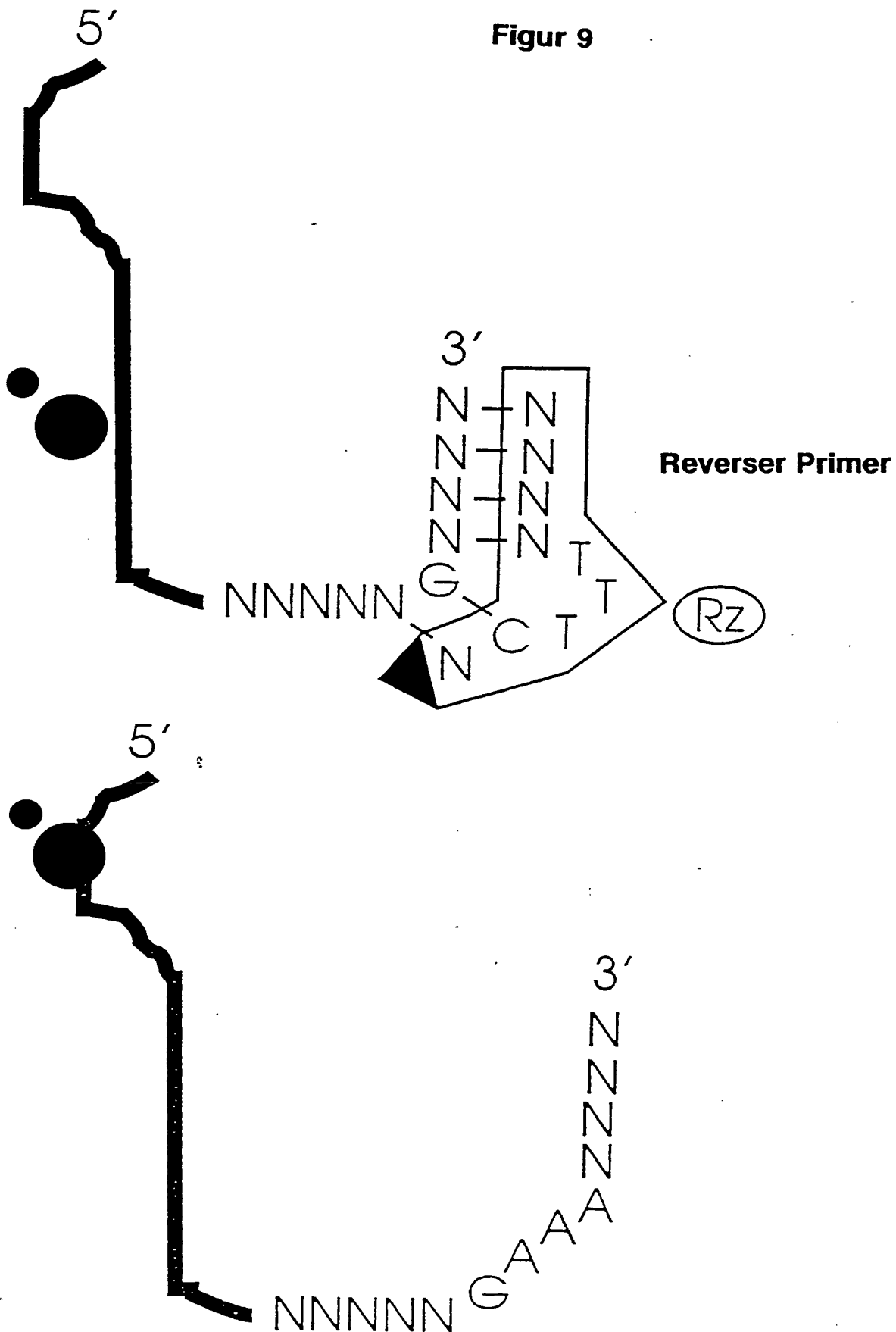
Figur 7



Figur 8

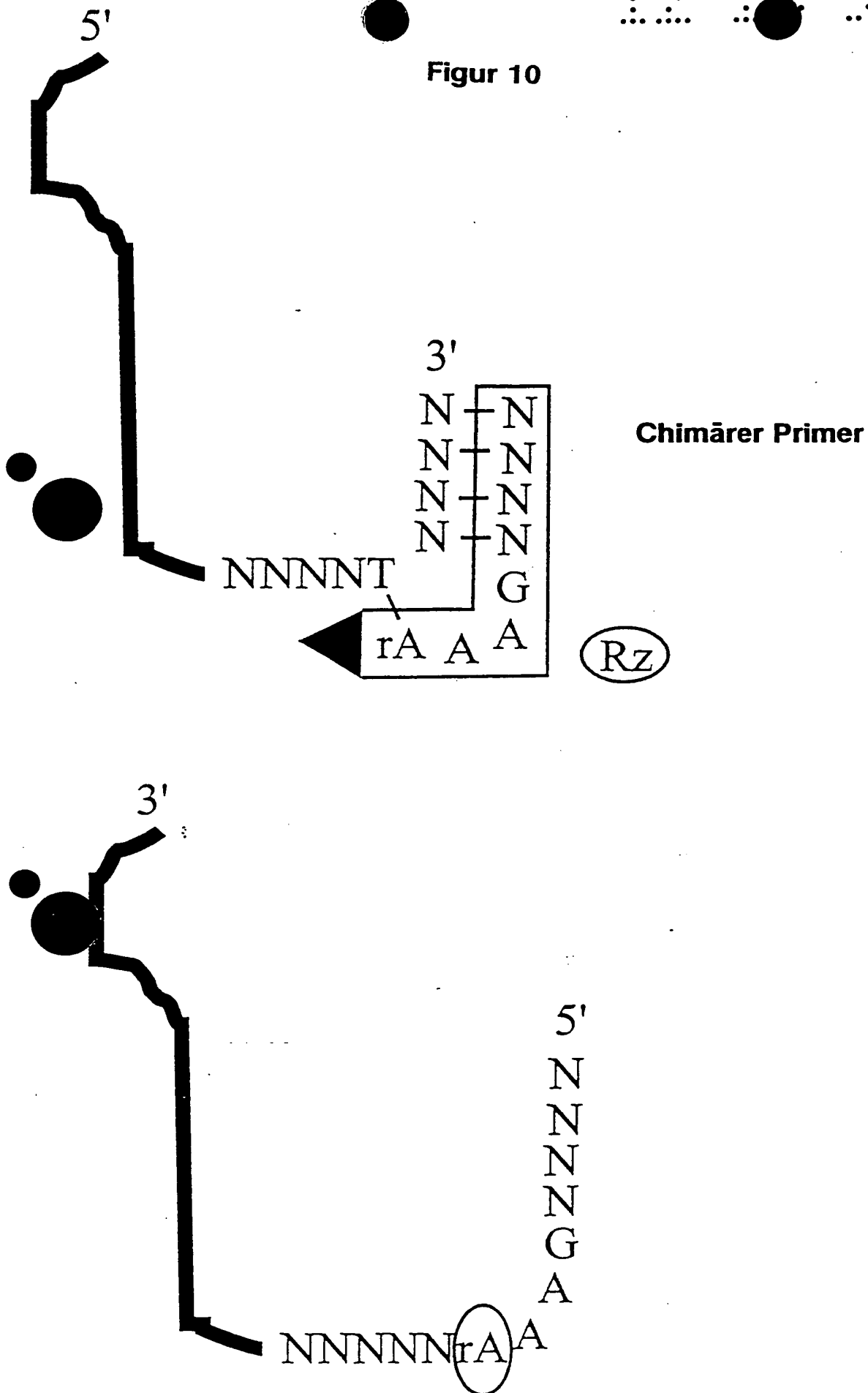


Figur 9



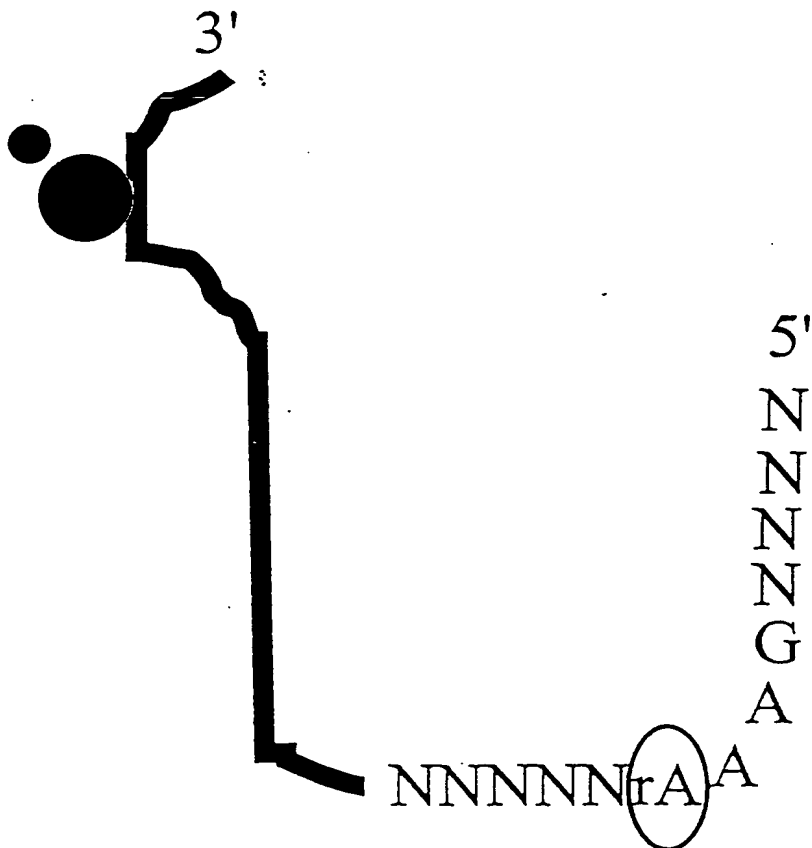
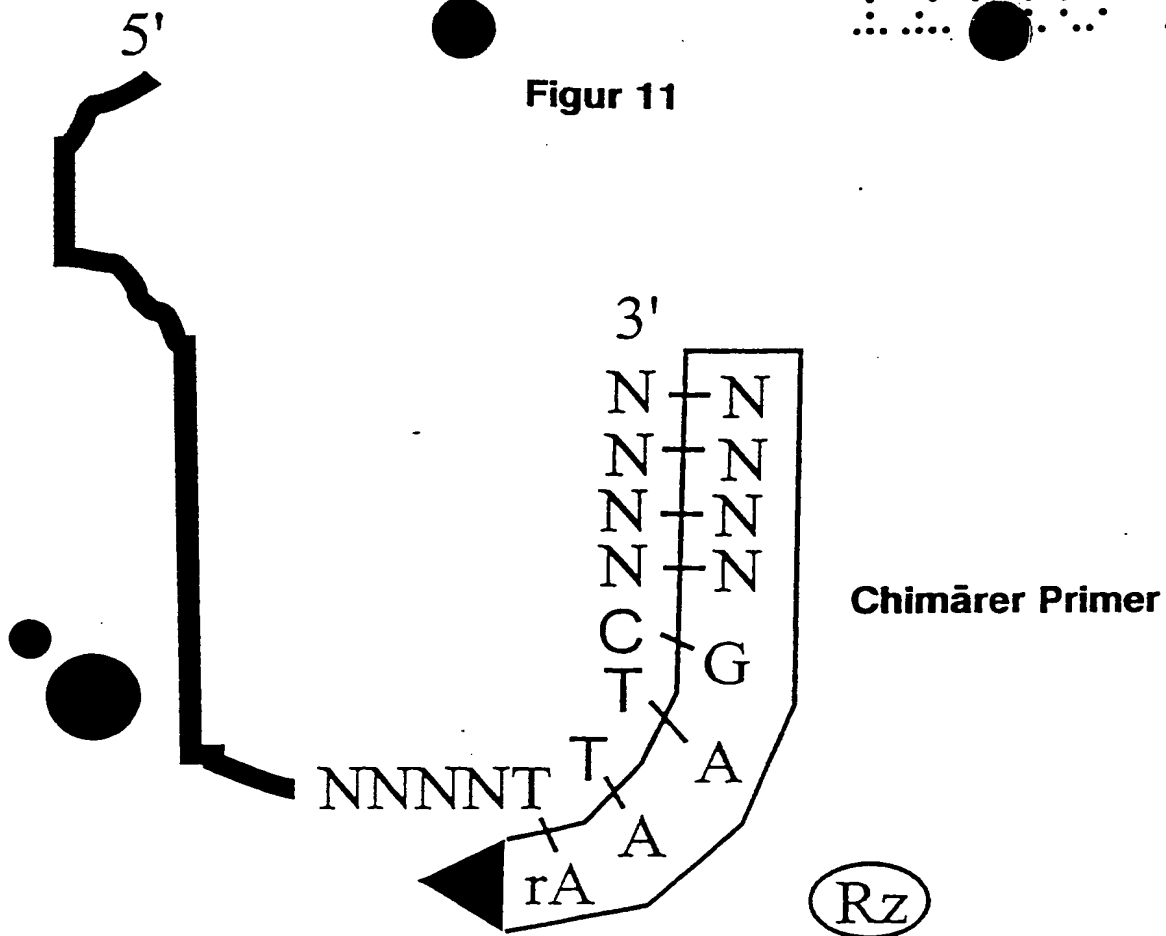
12 · 10 · 99 8

Figur 10



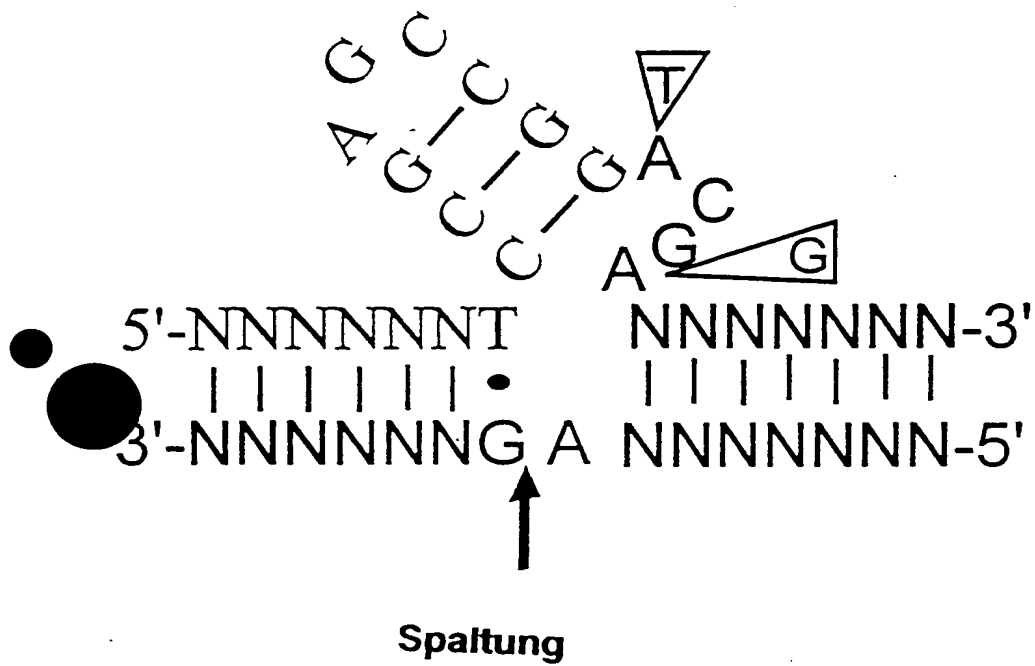
12.10.99 B

Figur 11



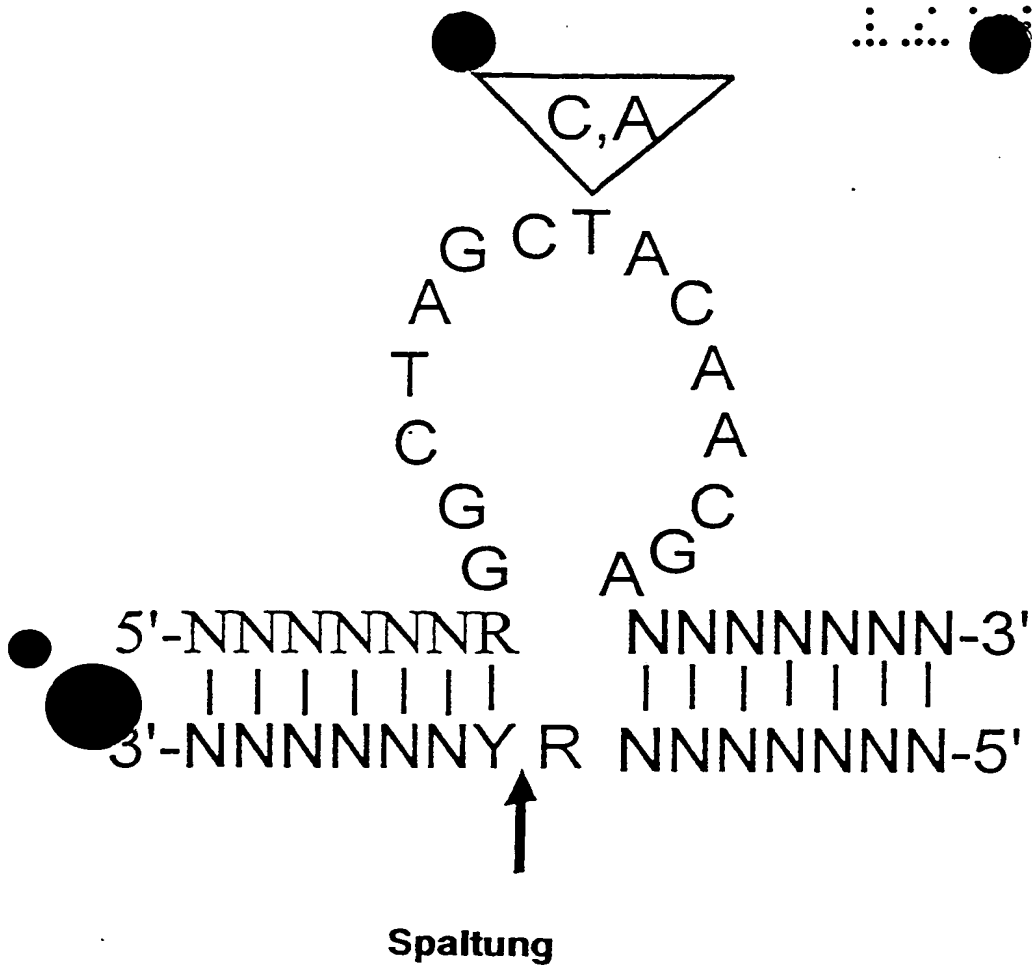


Figur 12



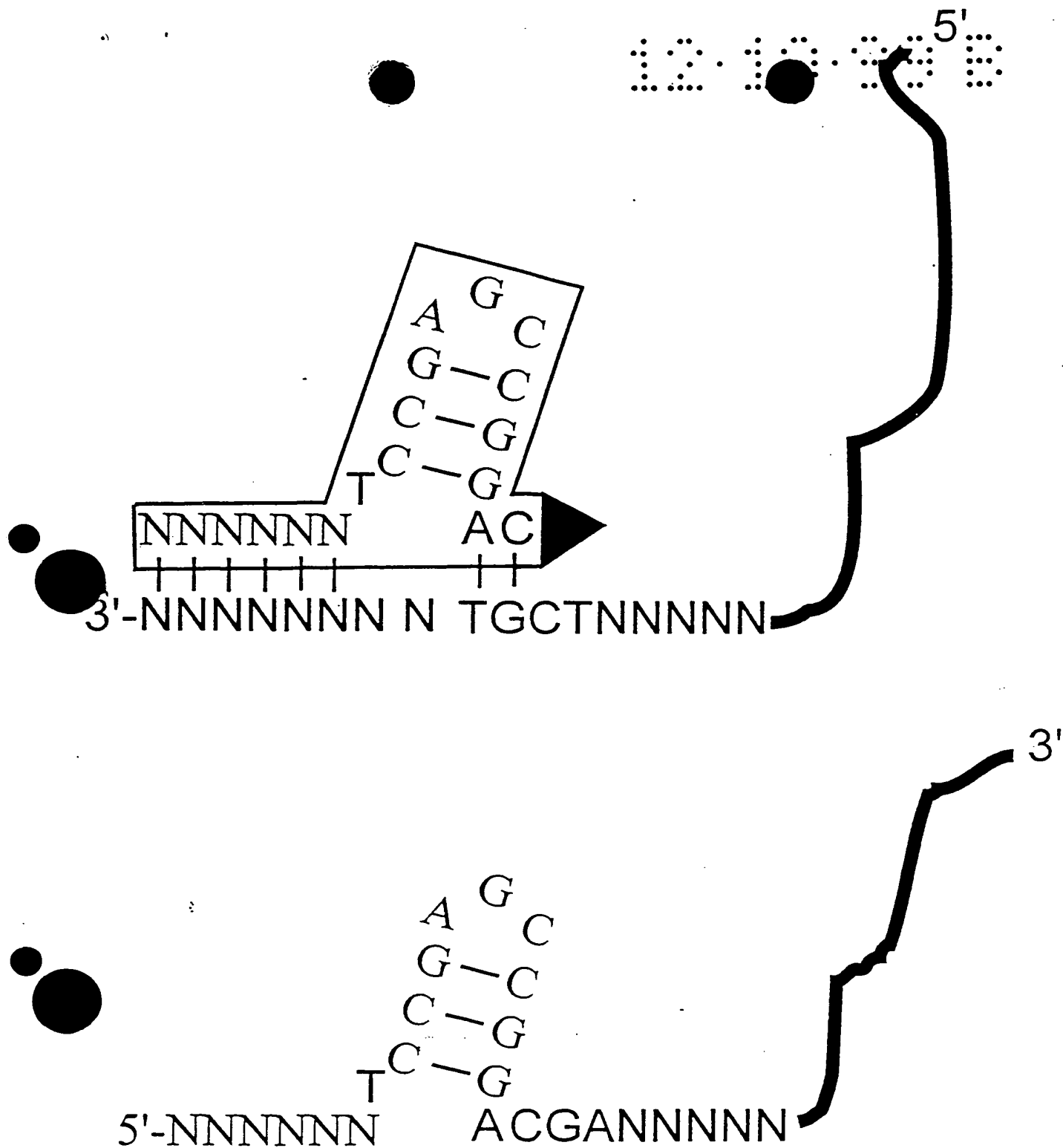
DNA-zymer: Prototyp A

12.10.99 B



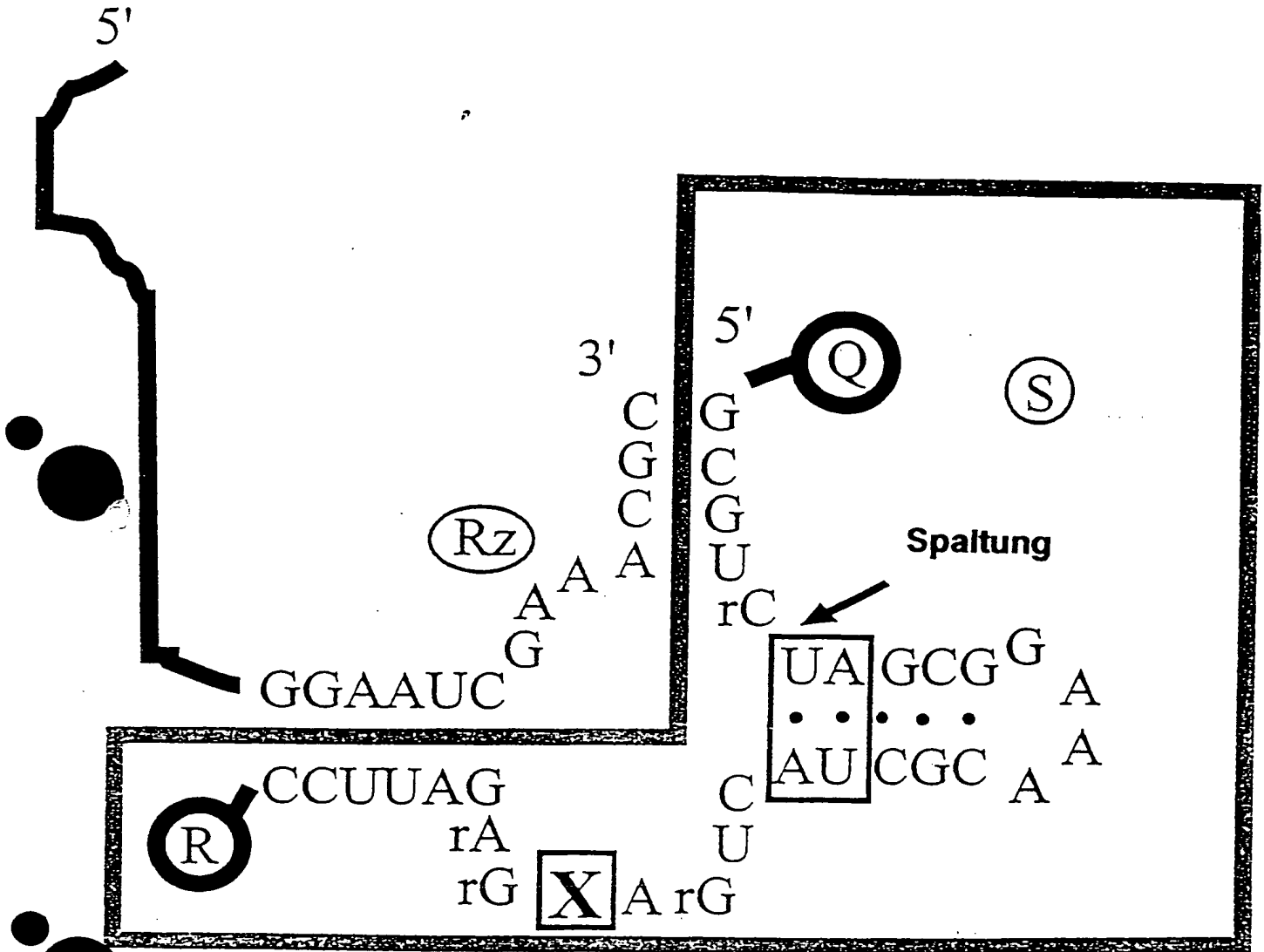
DNA-zymer: Prototype B

Figur 13



Figur 14

## Universelle Ribozymprobe



R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

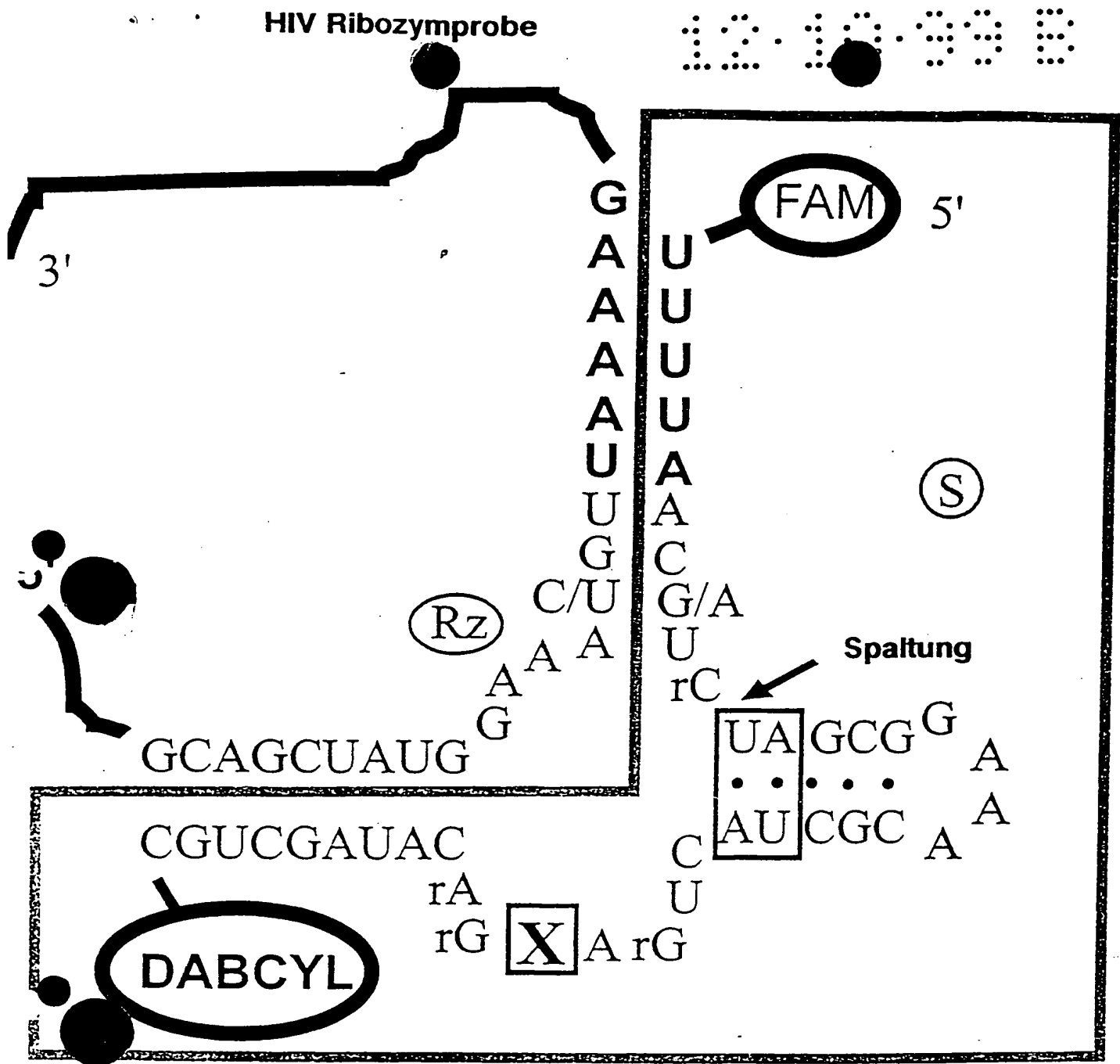
Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR

etc.

**X = Pyridin-4-one**

**r = essentielle Ribonukleotide**

**wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop**



X = Pyridin-4-one

r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

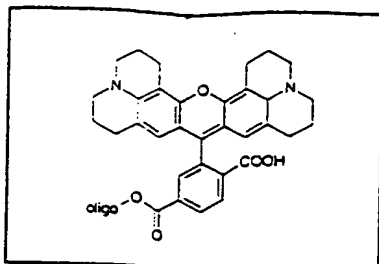
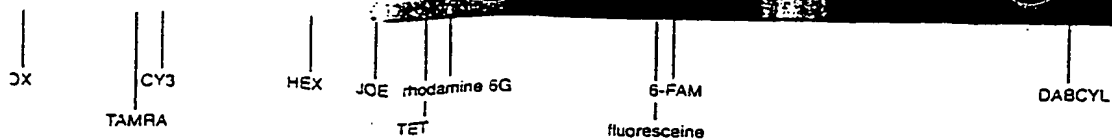
Figur 16

550

500

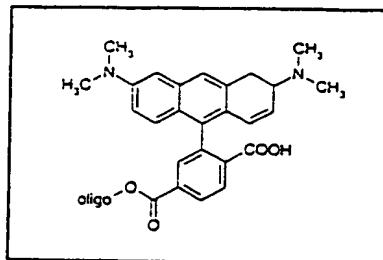
450

400

**ABSORPTION**

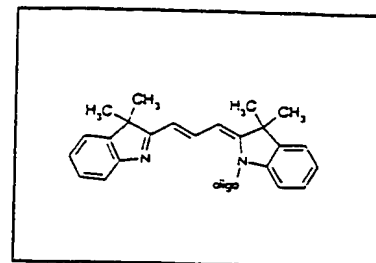
ROX (6-ROX)

ROX:  $\lambda_{max}$ : 568 nm  $\lambda_{max}$ : 595 nm  
6-ROX:  $\lambda_{max}$ : 575 nm  $\lambda_{max}$ : 602 nm



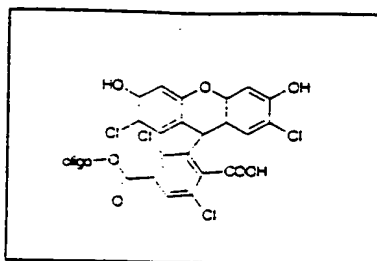
TAMRA

$\lambda_{max}$ : 555 nm  $\lambda_{max}$ : 580 nm



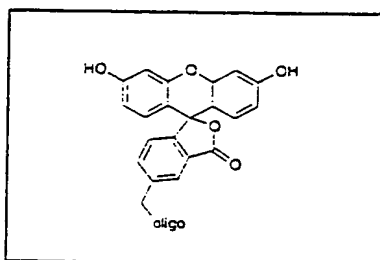
CY3

$\lambda_{max}$ : 552 nm  $\lambda_{max}$ : 565 nm



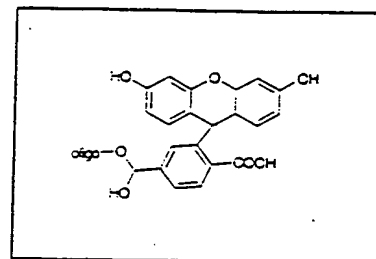
TET

$\lambda_{max}$ : 521 nm  $\lambda_{max}$ : 536 nm



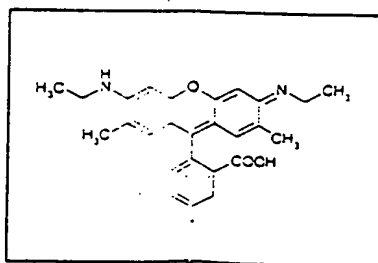
Fluorescein

$\lambda_{max}$ : 494 nm  $\lambda_{max}$ : 525 nm



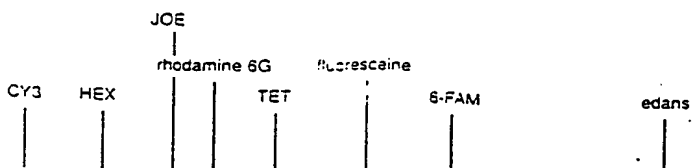
6-FAM

$\lambda_{max}$ : 492 nm  $\lambda_{max}$ : 515 nm



rhodamine 6G

$\lambda_{max}$ : 518 nm  $\lambda_{max}$ : 543 nm

**EMISSION**

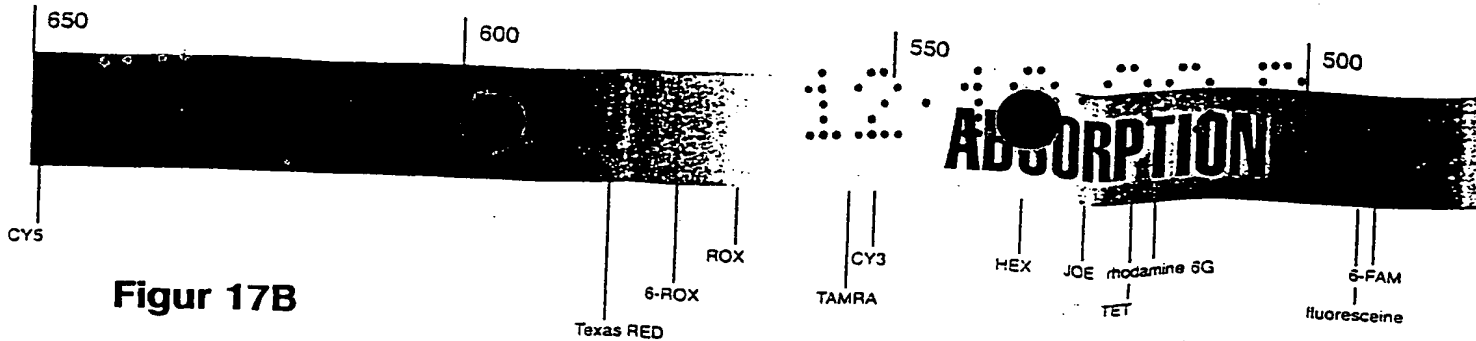
550

500

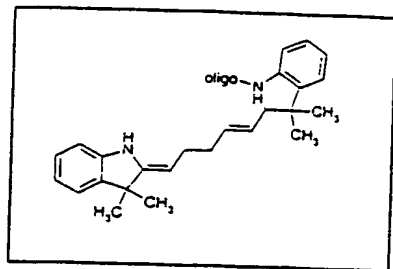
450

400

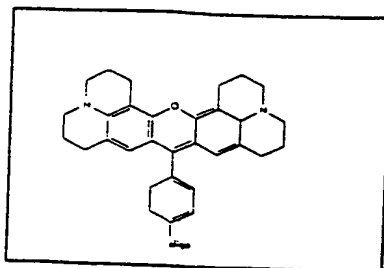
Figur 17A



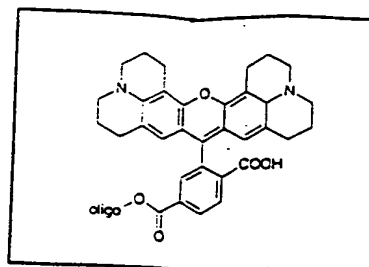
**Figur 17B**



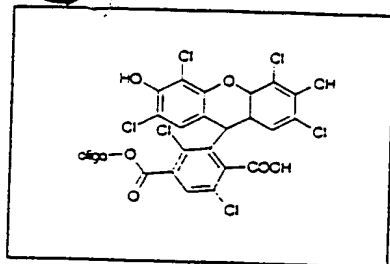
Cys  
 $\lambda_{max,A}: 651 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 674 \text{ nm}$



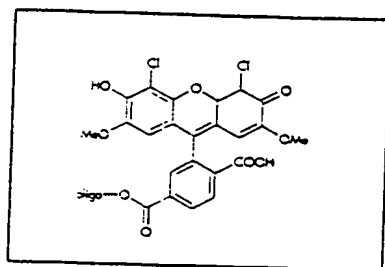
Texas Red  
 $\lambda_{max,A}: 583 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 603 \text{ nm}$



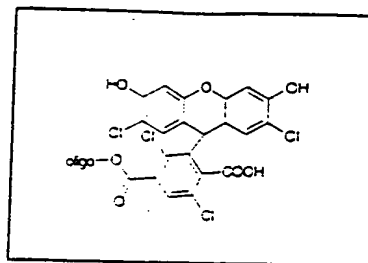
ROX (6-ROX)  
ROX:  $\lambda_{max,A}: 568 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 595 \text{ nm}$   
6-ROX:  $\lambda_{max,A}: 575 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 602 \text{ nm}$



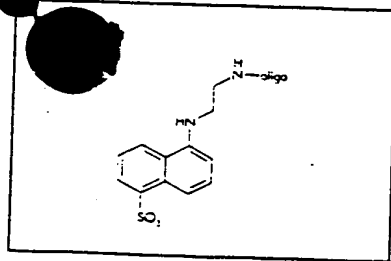
HEX  
 $\lambda_{max,A}: 535 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 556 \text{ nm}$



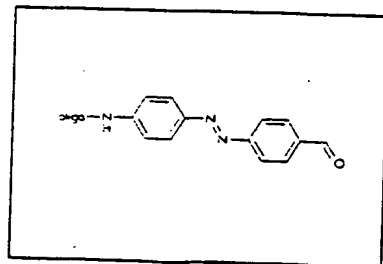
JOE  
 $\lambda_{max,A}: 527 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 548 \text{ nm}$



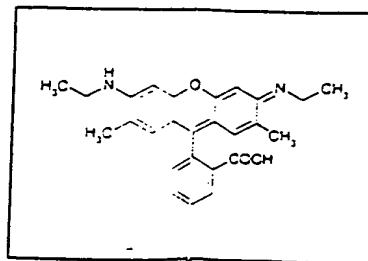
TET  
 $\lambda_{max,A}: 521 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 536 \text{ nm}$



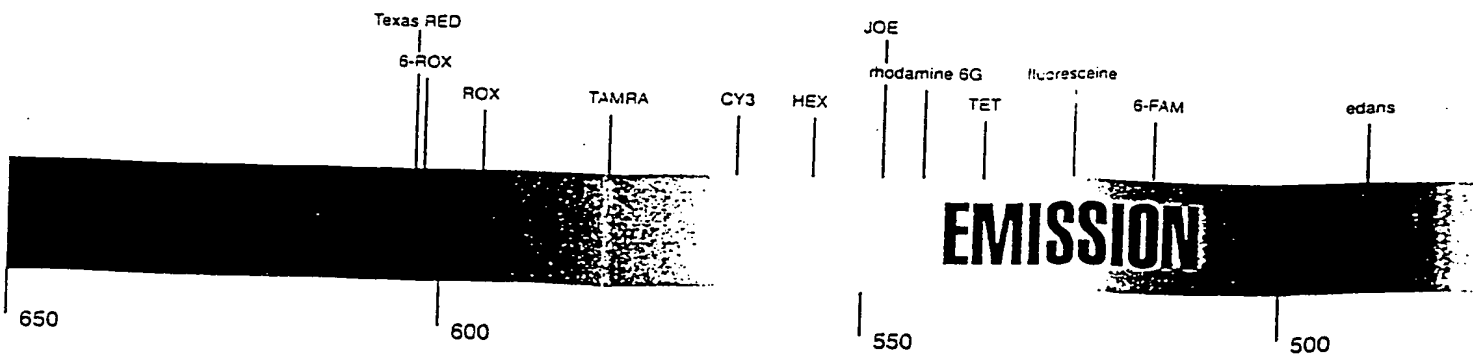
edans  
 $\lambda_{max,A}: 336 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 490 \text{ nm}$



dabcyf  
 $\lambda_{max,A}: 453 \text{ nm}$



rhodamine 6G  
 $\lambda_{max,A}: 518 \text{ nm}$   $\lambda_{max,E}: 543 \text{ nm}$



12.10.99 B

Fig. 17C

A (nm)	E (nm)	Feststoffe
349 336	448 490	AMCA ADANS
495 505 494 496	503 513 515 516	BODIPY 493/503 BODIPY LF 6-FAM, Fluorescein 6-OREGON Green 488
521 518 531 528 527	536 543 545 547 548	TET Rhodamin 6G (6-R6G) BODIPY FL Br2 BODIPY R6G 6-JOE
535 535	552 555	BODIPY 530/550 HEX
552 559	565 569	Cy3 BODIPY 558/568
542 546 560	574 579 580	BODIPY TMR 542/574 5-TAMRA NED
575 583 588	602 603 616	6-ROX TEXAS Red BODIPY TR 589/617
630 625 646 651	640 640 660 674	Light Cyclor RED 640 BODIPY 630/650 BODIPY 650/665 Cy5
700 678 685 685 743 787	710 703 705 705 767 807	Light Cyclor Red Cy 5.5 IRD 700 La Jolla Blue Cy 7 IRD 41

A = Absorption

E = Emission